

Aus der Klinik für Innere Medizin III

Kardiologie, Angiologie und internistische Intensivmedizin

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Prof. Dr. M. Böhm

**Die Rolle eines zellulären Eisendefizits für den Energiehaushalt, die
Funktion der Atmungskette, des Citratzyklus und die Produktion
reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2017

vorgelegt von:

Kira Béatrice Marie Hanschitz

geboren am 26.02.1992 in Homburg/Saar

Dekan: Prof. Dr. med. Michael Menger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Christoph Maack
2. Gutachter:

Meiner Familie.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
1 Zusammenfassung	1
1.1 Die Rolle eines zellulären Eisendefizits für den Energiehaushalt, die Funktion der Atmungskette, des Citratzyklus und die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)	1
1.2 The influence of cellular iron deficiency on the energy balance, the function of the respiratory chain, the Krebs cycle and the formation of reactive oxygen species (ROS)	3
2 Einleitung.....	5
2.1 Ursachen und Epidemiologie der Herzinsuffizienz.....	6
2.1.1 Definition	6
2.1.2 Epidemiologie.....	7
2.1.3 Die Physiologie der elektromechanischen Kopplung.....	8
2.1.4 Die Physiologie der mitochondrialen Energetik	10
2.1.5 Die Pathophysiologie der elektromechanischen Kopplung bei Herzinsuffizienz.....	12
2.1.6 Der Eisenstoffwechsel im menschlichen Körper.....	15
2.1.7 Systemische Regulation der Eisenhomöostase über das Hormon Hepcidin	18
2.1.8 Zelluläre Regulation der Eisenhomöostase über IRP1/IRP2	18
2.1.9 Die Rolle von Eisen in Mitochondrien	20
2.1.10 Die Rolle eines Eisenmangels bei chronischer Herzinsuffizienz und anderen Krankheitsbildern	22
2.1.11 Die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)	25
2.1.12 Die Rolle von ROS bei Herzinsuffizienz	27

2.1.13	Die Rolle von Eisen und ROS	28
2.1.14	Der Phänotyp von Hepatozyten-spezifischen IRP1/2 defizienten Mäuse	29
2.1.15	Die Entwicklung und der Phänotyp von Kardiomyozyten-spezifischen IRP1/2 defizienten Mäusen	30
2.1.16	Fragestellung der Arbeit	31
3	Materialien und Methoden	33
3.1	Materialien	33
3.1.1	Versuchstiere und Tierhaltung	33
3.1.2	Materialien für die Versuchsreihe an Kardiomyozyten	34
3.1.2.1	Verwendete Substanzen	34
3.1.2.2	Präparations- und Isolationsinstrumentarium	38
3.1.2.3	Narkosesystem	39
3.1.2.4	Anlage zur Messung von NAD(P)H/FADH ₂ und H ₂ O ₂	39
3.1.3	Materialien für die Versuchsreihe an Mitochondrien	41
3.1.4	Sonstige Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte	45
3.2	Methoden	47
3.2.1	Methoden für die Versuchsreihe an Kardiomyozyten	47
3.2.1.1	Mausmyozytenisolation nach AFCS	47
3.2.1.2	Lösungen	50
3.2.1.3	Behandlung der Kardiomyozyten für die H ₂ O ₂ -Bestimmung mit dem Farbstoff DCF	50
3.2.1.4	Beschichtung der Deckgläschen	51
3.2.1.5	Bestimmung der Zellverkürzung in Kardiomyozyten	51
3.2.1.6	Aufbau der IonOptix Anlage	54
3.2.1.7	Einstellung des Photomultiplier	55
3.2.1.8	Zulaufanlage	56

3.2.1.9	Übersicht über das Messprotokoll der zellulären Fluoreszenzen von NAD(P)H/FAD bzw. von NADH/DCF.....	57
3.2.1.10	Fluoreszenzfarbstoffe.....	57
3.2.1.11	NAD(P)H/FAD- Autofluoreszenzmessungen.....	57
3.2.1.12	H ₂ O ₂ -Bestimmung mittels DCF	58
3.2.1.13	Auswertung der Messergebnisse	59
3.2.2	Methoden für die Versuchsreihe an Mitochondrien	60
3.2.2.1	Mitochondrienisolation	60
3.2.2.2	Proteinbestimmung nach Lowry.....	61
3.2.2.3	Atmungsmessung	62
3.2.2.4	NAD(P)H-Messung	63
3.2.2.5	Messung von extramitochondrialem H ₂ O ₂ mittels Amplex Ultra-Red-Assay	64
3.2.2.6	Elektro-Paramagnetische Resonanzmessung	65
4	Ergebnisse.....	67
4.1	Versuchsreihe an Kardiomyozyten	67
4.1.1	Zellverkürzungsmessungen.....	67
4.1.2	Redoxstatus von NAD(P)H/NAD(P) ⁺ und FADH ₂ /FAD.....	70
4.1.3	Messungen zur Bestimmung von ROS mittels DCF	73
4.2	Ergebnisse der Versuchsreihe an Mitochondrien.....	75
4.2.1	Messungen zur Bestimmung mitochondrialer Atmung	75
4.2.2	Messungen der mitochondrial emittierten Superoxidradikale mittels elektro-paramagnetischer Resonanzmessung	78
4.2.3	Messungen zur Bestimmung der extramitochondrialen H ₂ O ₂ -Emission mittels Amplex Ultra-Red-Assay	79
4.2.4	Enzymmessungen.....	81
4.2.5	Messungen zur Entwicklung des NAD(P)H-Pools	83
5	Diskussion.....	87

5.1	Ausblick.....	95
6	Literaturverzeichnis	97
7	Abkürzungsverzeichnis.....	109
8	Curriculum Vitae	113
9	Danksagung	114

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Elektromechanische Kopplung und mitochondriale Energetik.	10
Abbildung 2: Physiologie und Pathophysiologie im Zusammenspiel von elektromechanischer Kopplung, mitochondrialer Energetik sowie oxidativem Stress in Kardiomyozyten.	14
Abbildung 3: Eisenstoffwechsel im menschlichen Körper.	17
Abbildung 4: Langendorff-Perfusionsanlage.	49
Abbildung 5: In der Anlage hängendes Herz.	49
Abbildung 6: Schematische Darstellung der IonOptix-Anlage zur Fluoreszenz- und Sarkomerlängenmessung.	54
Abbildung 7: PMT-Einstellung zur Messung der Fluoreszenzen von NAD(P)H/FAD bzw. DCF.	55
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Messkammer mit den Myozyten auf dem Mikroskop.	56
Abbildung 9: Exemplarisches Messfenster-Protokoll während Detektion von NAD(P)H/FAD mit Zellverkürzung mit IonWizard.	67
Abbildung 10: Sarkomerlängen [μm] zu den in Abbildung 9 beschriebenen Messzeitpunkten im Vergleich zwischen WT- (n=22) und IRP1/IRP2-KO (n=27) -Myozyten.	69
Abbildung 11: Fraktionelle Sarkomerverkürzung [Prozent vom Basalwert] im Vergleich zwischen WT- (n=22) und IRP1/IRP2-KO (n=27) -Myozyten.	70
Abbildung 12: Redoxstatus von NAD(P)H und FAD [%] im Vergleich zwischen WT- (n=22) und IRP1/IRP2-KO (n=27) -Myozyten.	71
Abbildung 13: Relation der Autofluoreszenzintensitäten von NAD(P)H/FAD,	72
Abbildung 14: Intensitäten des DCF-Signals [mV] im Vergleich von WT- (n=21) und IRP1/IRP2-KO (n=19) -Myozyten.	73
Abbildung 15: Verlauf des DCF-Signals im Vergleich von WT- (n=21) und IRP1/IRP2-KO (n=19) -Myozyten.	74
Abbildung 16: Mitochondrialer Sauerstoffverbrauch [$\text{mmol O}_2/\text{mg Protein} \cdot \text{min}$] im Vergleich von WT- (n=4) und IRP1/IRP2-KO (n=6) -Mitochondrien.	76
Abbildung 17: Respiratorischer Quotient (RQ) in WT- (n=4) und IRP1/IRP2-KO (n=6) -Mitochondrien.	77

Abbildung 18: Superoxidproduktion [pmol $\bullet\text{O}_2^-/\text{min}$] im Vergleich von WT- (n=3) und IRP1/IRP2-KO (n=5) -Mitochondrien.	79
Abbildung 19: H_2O_2 -Emission [pmol/mg Protein*min] im Vergleich von WT- (n=4) und IRP1/IRP2-KO (n=6) -Mitochondrien.	81
Abbildung 20: Enzymaktivitäten [U/mg*min] wichtiger Citratzyklus-Enzyme im Vergleich von WT- (n=8) und IRP1/IRP2-KO (n=12) -Mitochondrien.	83
Abbildung 21: Entwicklung der NAD(P)H-Regeneration [% of control] im Vergleich von WT- (n=3) und IRP1/IRP2-KO (n=5) -Mitochondrien.	85

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stocklösung.....	34
Tabelle 2: Substanzen zur Herstellung der Myozyten-Isolutionslösung.	35
Tabelle 3: Substanzen zur Herstellung von Stopppuffer 1.	35
Tabelle 4: Substanzen zur Herstellung von Stopppuffer 2.	35
Tabelle 5: Substanzen zur Herstellung des Liberasepuffers.	36
Tabelle 6: Substanzen zur Herstellung des Zellmediums.	36
Tabelle 7: Substanzen der Tyrodelösung.....	36
Tabelle 8: Weitere Substanzen zur Myozytenmessung im Fluoreszenzmikroskop.	37
Tabelle 9: Zur DCF-Messung verwendete Substanzen.....	37
Tabelle 10: Zur Beschichtung der Deckgläschen verwendete Substanz.....	37
Tabelle 11: Direkt an den Versuchstieren angewandte Substanzen.	38
Tabelle 12: Präparations- und Isolationsinstrumentarium zur Kanülierung und Perfusion der Herzen.	38
Tabelle 13: Übersicht der verwendeten Spiegel.....	40
Tabelle 14: Zur Herstellung der Mitochondrien-Isolutionslösung IS verwendete Substanzen.....	41
Tabelle 15: Zur Herstellung der Mitochondrien-Suspensionslösung MSS verwendete Substanzen.....	41
Tabelle 16: Zur Herstellung der BSA/Proteinase-Lösung verwendete Substanzen.	42
Tabelle 17: Mäusenarkose bei Mitochondrienisolation.....	42
Tabelle 18: Atmungspuffer für die Atmungsmessung.....	42
Tabelle 19: Zugegebene Substrate während der Atmungsmessung.....	43
Tabelle 20: Proteinbestimmung nach Lowry et al.....	43
Tabelle 21: H ₂ O ₂ -Bestimmung mittels Amplex Ultra-Red Assay.	43
Tabelle 22: Substanzen zur NAD(P)H-Bestimmung.....	44
Tabelle 23: Superoxid-Bestimmung mittels elektro-paramagnetischer Resonanzmessung.	44
Tabelle 24: Weitere Materialien für die Versuchsreihe an Mitochondrien. ...	45
Tabelle 25: Calciumaufbau.	50
Tabelle 26: Pipettierschema für die Messungen mit Amplex Ultra-Red.	64

Tabelle 27: Pipettierschema für die elektro-paramagnetische Resonanzmessung.	66
---	----

1 Zusammenfassung

1.1 Die Rolle eines zellulären Eisendefizits für den Energiehaushalt, die Funktion der Atmungskette, des Citratzyklus und die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Die Rolle von Eisen in der Pathogenese der Herzinsuffizienz gerät jüngst immer mehr in den Fokus der aktuellen Forschung. So stellt ein Eisendefizit bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz einen negativen Prädiktor des klinischen Status und der Prognose der Patienten dar. Weiterhin hat die intravenöse Substitution von Eisen bei Patienten mit Herzinsuffizienz zu einer Verbesserung der Symptomatik, der Lebensqualität und der Hospitalisierung, nicht jedoch des Überlebens geführt. Zum jetzigen Zeitpunkt ist es unklar, ob ein kardiales Eisendefizit eine kausale Rolle für die Pathogenese der Herzinsuffizienz spielt. Aus diesem Grunde war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, dies in einem Mausmodell zu verifizieren, in welchem die Eisenspiegel in Herzmuskelzellen durch spezifische Deletion (KO) der „iron-regulatory proteins“ IRP1 und IRP2, welche den Eisenhaushalt auf zellulärer Ebene koordinieren, um bis zu 30% reduziert sind. Es wurden hierbei die Atmung und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) Produktion an isolierten Mitochondrien sowie die kontraktile Funktion, der Redoxstatus von NAD(P)H/NAD(P)⁺ und FADH₂/FAD sowie die ROS-Produktion in isolierten Herzmuskelzellen von IRP1/IRP2-KO oder Wildtyp-Kontroll-Mäusen verglichen. Darüber hinaus wurden die Aktivitäten verschiedener (und auch Eisen-abhängiger) Citratzyklus-Enzyme bestimmt. Die mitochondriale Atmung war in der Gegenwart von Substraten (Pyruvat/Malat) und der Abwesenheit (state 2) oder Gegenwart von ADP (state 3) nicht unterschiedlich zwischen den Genotypen. Ebenfalls die Produktion von Superoxid ($\bullet\text{O}_2^-$; mittels Elektron Spin Resonanz Messung) oder die Emission von Wasserstoffperoxid (H₂O₂; mittels Amplex Ultra-Red-Assay) waren nicht unterschiedlich zwischen IRP1/IRP2-KO und Wildtyp-Mitochondrien. Schließlich waren auch die Aktivität wichtiger Citratzyklus-Enzyme sowie die

Substrat-abhängige Generation von NADH und NADPH in isolierten Mitochondrien nicht unterschiedlich zwischen den Genotypen. Isolierte Kardiomyozyten wurden einem Protokoll ausgesetzt, welches einen physiologischen Anstieg der Arbeitslast simulierte (durch β -adrenerge Stimulation und das Anheben der Stimulationsfrequenz von 0,5 auf 5 Hz). Hierunter ergaben sich keine Unterschiede zwischen Wildtyp und IRP1/IRP2-KO hinsichtlich der systolischen und diastolischen Funktion der Herzmuskelzellen, der transienten Veränderungen des NAD(P)H- und FAD-Redoxstatus sowie der ROS-Emission (bestimmt durch den Fluoreszenzfarbstoff Dichlorodihydrofluoreszindiazetat, DCF).

Wir schlussfolgern, dass die Deletion von IRP1 und IRP2 in *Herzmuskelzellen* keinen relevanten Einfluss auf die Funktion der Mitochondrien sowie der Herzmuskelzellen hat. Dies steht im Gegensatz zu Ergebnissen an einem Mausmodell mit IRP1/IRP2-KO in *Hepatozyten*, in denen eine ausgeprägte mitochondriale Dysfunktion und Leberversagen die Folge des KO war. Die Ursachen für diese organspezifischen Unterschiede im zellulären Eisenhaushalt sind bisher unklar. Es ist möglich, dass in IRP1/IRP2-KO Kardiomyozyten und Mitochondrien die Eisendefizienz durch andere Mechanismen kompensiert wird. Darüber hinaus ist es denkbar, dass das Fehlen von relevanten Unterschieden zwischen beiden Versuchsgruppen darauf zurückzuführen ist, dass sich die negativen Auswirkungen eines zellulären Eisendefizits, wie beispielsweise die Verschlechterung der Leistungsfähigkeit und Lebensqualität der Patienten, nicht primär durch einen *kardialen* Eisenmangel manifestieren, sondern möglicherweise an anderen Stellen im Organismus, wie zum Beispiel an der Skelettmuskulatur. Somit bleibt die exakte Rolle von Eisen in der Pathogenese der Herzinsuffizienz unvollständig geklärt, da sowohl ein Mangel als auch ein Überschuss an Eisen prognostisch ungünstige Parameter bei Patienten mit Herzinsuffizienz darstellen und somit beide jeweils therapeutische Ansatzpunkte bieten könnten.

1.2 The influence of cellular iron deficiency on the energy balance, the function of the respiratory chain, the Krebs cycle and the formation of reactive oxygen species (ROS)

Recently, the role of iron in the pathogenesis of chronic heart failure has become the focus of current research. It has been observed in clinical trials that iron deficiency in patients with chronic heart failure constitutes a negative predictor of the patients' clinical status and prognosis. Moreover, intravenous iron substitution in the treatment of chronic heart failure has improved the patients' symptoms, quality of life and hospitalization, but not their survival. It is currently unclear whether a cardiac iron deficiency plays a causal role in the pathogenesis of chronic heart failure. Therefore, the aim of the present study was to verify such a possible causality in a mouse model in which the iron levels in cardiomyocytes are reduced by up to 30% due to a specific deletion (KO) of the "iron-regulatory proteins" IRP1 and IRP2, which coordinate the iron balance at the cellular level. For this purpose, we compared mitochondrial respiration and formation of reactive oxygen species (ROS) in isolated mitochondria as well as the contractile function, the redox state of NAD(P)H/NAD(P)⁺ and FADH₂/FAD and also ROS formation in isolated heart muscle cells of IRP1/IRP2-KO or wild-type control mice. In addition, the activities of several (and also iron-dependent) Krebs cycle enzymes were determined. There were no differences detectable between the genotypes concerning mitochondrial respiration, neither in the presence of substrates (pyruvate/malate) and the absence (state 2) or presence of ADP (state 3), respectively. Furthermore, the formation of superoxide ($\bullet\text{O}_2^-$; by electron spin resonance measurements) or the emission of hydrogen peroxide (H₂O₂; by Amplex Ultra-Red-Assay) in IRP1/IRP2-KO mitochondria did not differ from those in wild-type mitochondria. Ultimately, the activities of important Krebs cycle enzymes as well as the substrate-dependent production of NADH and NADPH in isolated mitochondria were not different between the genotypes. Isolated cardiomyocytes were exposed to a protocol simulating a physiological increase in workload (by β -adrenergic stimulation and raising the stimulation frequency from 0.5 to 5 Hz). Concerning the

systolic and diastolic function of the cardiomyocytes there were no differences detectable between the wild type and the IRP1/IRP2-KO mice neither regarding the transient changes of the NAD(P)H and the FAD redox state nor relating to the emission of ROS (which was determined by the fluorescent dye dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCF).

We conclude that the deletion of IRP1 and IRP2 in *cardiac* myocytes exerts no relevant influence on the function of mitochondria and the cardiac myocytes *per se*. This is in contrast to observations in a mouse model with *hepatocyte*-specific KO of IRP1/IRP2, in which the KO was accompanied by severe mitochondrial dysfunction and liver failure. The causes of these organ-specific differences in the impact of cellular iron depletion are still unclear. Potentially, the iron deficiency is compensated by other mechanisms in IRP1/IRP2-KO cardiomyocytes and mitochondria. Furthermore, it is conceivable that in patients with heart failure, the iron deficiency does not alter *cardiac* function, but rather the function of other organs such as skeletal muscles, which may contribute to the functional deficits of these patients. This may also explain why symptoms, but not prognosis was improved by iron supplementation in patients with heart failure. Thus, the exact role of iron (deficiency) in the pathogenesis of chronic heart failure remains uncertain, since both a deficiency as well as an excess of iron predict an adverse outcome in patients with chronic heart failure and therefore, both conditions may offer therapeutic targets.

2 Einleitung

Das Syndrom der Herzinsuffizienz ist der derzeit häufigste Grund für einen stationären Krankenhausaufenthalt in Deutschland (Statistisches Bundesamt 2013). Etwa 1-2% der Bevölkerung der westlichen Industriestaaten leidet an einer Herzinsuffizienz, wobei mehr als 10% der Erkrankten älter als 70 Jahre sind (McMurray, Adamopoulos et al. 2012). Während man die absolute Zahl der momentan an einer Herzinsuffizienz erkrankten Patienten in Deutschland mit einem Lebensalter über 80 Jahre auf ca. 141.000 schätzt, prognostizieren Studien einen stetigen Anstieg der Prävalenz und Inzidenz, sodass im Jahre 2050 bereits mit über 350.000 Erkrankten zu rechnen ist (Neumann, Biermann et al. 2009). Hinsichtlich der Krankenhausaufnahmen und Todesfälle lassen sich geschlechts- sowie altersspezifische Unterschiede feststellen. So war bereits im Jahre 2007 die Herzinsuffizienz bei Frauen am häufigsten ursächlich für einen Krankenhausaufenthalt, während diese Diagnose bei den Männern an dritter Stelle der häufigsten Krankenhauseinweisungen rangierte (Neumann, Biermann et al. 2009). Im Jahr 2013 war das Syndrom der Herzinsuffizienz geschlechtsübergreifend der häufigste Grund für einen Krankenhausaufenthalt. Hierbei waren die absoluten Zahlen seit 2007 bereits immens angestiegen (Statistisches Bundesamt 2015). Diese Zahlen belegen die zunehmende Bedeutung der Herzinsuffizienz, welche auch durch die Todesursachenstatistik angezeigt wird. Hier rangierte die Erkrankung im Jahre 2013 nach der chronisch ischämischen Herzkrankheit sowie dem akuten Myokardinfarkt mit rund 45.815 Verstorbenen auf Rang drei. Damit führte die Herzinsuffizienz noch häufiger zum Tode als die Krebsleiden, bei denen das Lungen- und Bronchialkarzinom (44.813) die häufigste Todesursache darstellte (Statistisches Bundesamt 2015). Aufgrund der Häufigkeit der Diagnosestellung sowie der teuren Behandlungskosten macht die Herzinsuffizienz in den westlichen Industrienationen 1-2% und in Deutschland etwa 1,1% der direkten Krankheitskosten aus (Neumann, Biermann et al. 2009, McMurray, Adamopoulos et al. 2012). Diese Kosten werden in Zukunft weiter ansteigen (Lloyd-Jones, Larson et al. 2002). Dies ist der Fall, da aufgrund des medizinischen Fortschrittes die Alterung der

Gesellschaft und damit die Prävalenz und Inzidenz der Herzinsuffizienz bedeutend zunehmen werden. Andererseits ist das Syndrom neben der Redundanz von stationären Behandlungen ebenfalls durch eine schlechte Langzeitprognose gekennzeichnet, weshalb die Herzinsuffizienz nicht nur in medizinischer, sondern auch in ökonomischer Hinsicht eine Belastung für die Gesellschaft darstellt (Neumann, Biermann et al. 2009). Die Kosten, die dem deutschen Gesundheitswesen infolge der Diagnose entstanden, beliefen sich schon im Jahre 2006 auf 2,9 Milliarden Euro, wobei der Großteil hiervon den Ausgaben durch die stationäre Versorgung geschuldet war. Diese machten mit 1,7 Milliarden Euro 60% der Behandlungskosten aus, während 40% der Gesamtkosten und somit 1,3 Milliarden Euro auf die Krankenhausaufenthalte entfielen. Die übrigen Kosten entstanden durch Rehabilitationsmaßnahmen sowie Pflegeeinrichtungen. Aufgrund der steigenden Fallzahlen ist es erforderlich, Präventions- sowie Behandlungskonzepte zu gestalten, um in den kommenden Jahren der wachsenden Herausforderung hinsichtlich der Patientenversorgung gerecht werden zu können (Neumann, Biermann et al. 2009).

2.1 Ursachen und Epidemiologie der Herzinsuffizienz

2.1.1 Definition

Als Herzinsuffizienz bezeichnet man die Unfähigkeit des Herzens, das vom Organismus benötigte Herzzeitvolumen bei normalem enddiastolischen Ventrikeldruck zu fördern (Herold 2013). Aufgrund der ventrikulären Funktionsstörung resultiert in klinischer Hinsicht der Symptomkomplex einer verminderten körperlichen Belastbarkeit mit schneller Ermüdbarkeit und Luftnot (WHO 1995). Es existieren verschiedene Einteilungsmuster, die jeweils unterschiedliche Aspekte des Syndroms berücksichtigen. Hinsichtlich des Herzzeitvolumens unterscheidet man das „Low-output“-Versagen, das durch ein Vorwärtsversagen mit vermindertem Herzzeitvolumen sowie kühler Peripherie gekennzeichnet ist, sowie das „High-output“-Versagen, bei dem sich zwar ein erhöhtes Herzzeitvolumen, jedoch beispielsweise bedingt durch eine Anämie eine mangelnde O₂-Versorgung in der warmen Peripherie

findet. Weiterhin kann man die Herzinsuffizienz in Bezug auf den jeweils vermehrt betroffenen Ventrikel unterscheiden, wobei neben der Globalinsuffizienz auch isoliert nur der linke oder (eher selten) der rechte Ventrikel erkrankt sein können. Bei Betrachtung des zeitlichen Verlaufes bei der Entwicklung kann die akute dekompensierte (ADHF) von der chronischen Herzinsuffizienz abgegrenzt werden. Während erstere mit plötzlichen Geschehen wie einem akuten Koronarsyndrom, auftretenden Insuffizienz- oder Shuntvitien, einer Tachykardie oder einer Perikardtamponade vergesellschaftet sein kann, entwickelt sich die chronische Herzinsuffizienz über einen längeren Zeitraum von Monaten oder Jahren. Auch hinsichtlich der Pathophysiologie ist eine Einteilung gebräuchlich. Die systolische Herzinsuffizienz (heart failure with *reduced* ejection fraction, HFrEF) resultiert aus einer Kontraktionsstörung des Myokards, typischerweise hervorgerufen durch einen vorangegangenen Infarkt oder in Folge einer koronaren Herzkrankheit. Bei der diastolischen Herzinsuffizienz (heart failure with *preserved* ejection fraction, HFpEF) ist die systolische Pumpfunktion erhalten, jedoch sind die diastolische Dehnbarkeit sowie Relaxation des linken Ventrikels vermindert. Die Genese dieser Form sind meist eine Herzhypertrophie oder eine Behinderung der Ventrikelfüllung (Herold 2013). Jedoch ist bis heute nach aktueller Datenlage nicht vollends geklärt, welches letztendlich die genauen Mechanismen sind, die die kardiale Dysfunktion und die terminale Herzinsuffizienz herbeiführen.

2.1.2 Epidemiologie

Angesichts des demografischen Wandels und der zunehmenden Alterung der Gesellschaft gewinnt die Diagnose der Herzinsuffizienz als eine der häufigsten internistischen Erkrankungen immer mehr an Bedeutung. Das Lebenszeitrisiko für eine Erkrankung schätzt man auf durchschnittlich 20% (Lloyd-Jones, Larson et al. 2002, Bauriedel 2005). Der Prozentsatz der derzeit in den westlichen Ländern Erkrankten wird auf 1-2% der Bevölkerung anberaumt (McMurray, Adamopoulos et al. 2012). Die Prävalenz ist deutlich altersabhängig. Dabei nehmen die Fallzahlen ab einem Alter von 50 Jahren kontinuierlich zu; in dieser Dekade leidet 1% der Bevölkerung an einer

Herzinsuffizienz. In der sechsten Dekade sind bereits 3% betroffen, bis die Herzinsuffizienz bei Personen über 80 Jahren mit einer Prävalenz von 10% (Hoppe, Erdmann et al. 2001) häufiger diagnostiziert wird als eine ischämische Herzkrankheit, und ab einem Alter über 85 Jahren sogar die Fallzahlen von bösartigen Neubildungen übersteigt (Neumann, Biermann et al. 2009). Auch geschlechtsspezifische Unterschiede konnten festgestellt werden, da die Prävalenz mit einer Relation von 1,5:1 zu Ungunsten der Männer ausfällt. In der Framingham-Studie konnte herausgefunden werden, dass in 50% der Fälle ein Hypertonus der Erkrankung zugrunde liegt (Lloyd-Jones, Larson et al. 2002). Da letztgenannter oftmals zu einer koronaren Herzkrankheit und im Anschluss über einen Myokardinfarkt ebenfalls zur Herzinsuffizienz führt, können Hypertonie sowie KHK und ein vorausgegangener Myokardinfarkt als die häufigsten Ursachen deklariert werden (Yusuf and Pitt 2002, Herold 2013). Die in den letzten Jahren deutlich verbesserten Überlebensraten beim Myokardinfarkt und die zunehmende Alterung der Bevölkerung tragen somit entscheidend zu der raschen Zunahme der Prävalenz der Herzinsuffizienz bei (Stewart, MacIntyre et al. 2003, Freund, Baldauf et al. 2011).

2.1.3 Die Physiologie der elektromechanischen Kopplung

Im Zuge eines kardialen Aktionspotentials (AP) depolarisiert die Zellmembran und es kommt zum Einstrom von Calcium (Ca^{2+}) über L-Typ-Calciumkanäle (LTCC) in die Kardiomyozyten. Dieser Ca^{2+} -Einstrom triggert durch Bindung an die intrazellulären Ryanodinrezeptoren (RyR2) innerhalb der Zelle die Freisetzung einer größeren Ca^{2+} -Fraktion aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR). Dieser Effekt ist auf die enge lokale Nähe von LTCC und RyR2 zurückzuführen. Die LTCC sind in die Phospholipidschicht der Transversaltubuli eingelagert, die wiederum an die Terminalzysten des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) grenzen. Hierdurch entsteht eine sogenannte Ca^{2+} -„Mikrodomäne“ zwischen LTCC und SR (Maack 2008, Kohlhaas and Maack 2013). Durch die Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR und die damit erzielte Erhöhung der zytosolischen

Ca^{2+} -Konzentration von ~ 100 nmol/l auf 500-800 nmol/l kommt es zur raschen Aktivierung der Myofilamente und somit zur Kontraktion der Herzmuskelzelle (Bers 2008). Nach der Kontraktion wird die Menge an Ca^{2+} , die aus dem SR freigesetzt wurde, über die SR- Ca^{2+} -ATPase (SERCA) wieder ins SR aufgenommen, während die Menge, die über LTCC in die Zelle gelangte, überwiegend über den sarkolemmalen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) nach extrazellulär transportiert wird.

Die elektromechanische Kopplung wird durch β -adrenerge Stimulation reguliert. Hierbei kommt es zur Phosphorylierung Ca^{2+} -modulierender Proteine durch die Proteinkinase A (PKA) sowie die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) (Maier and Bers 2007, Grimm and Brown 2010). Der β -adrenerge Effekt im Herzen erfolgt vor allem über die Katecholamine Noradrenalin und Adrenalin, welche bevorzugt an α_1 -, β_1 - sowie β_2 -Adrenozeptoren binden. Daraufhin kommt es zur Aktivierung eines GTP-bindenden Proteins (G_s), welches in der Folge die Bildung von cAMP durch die Adenylatzyklase induziert. cAMP aktiviert nun die Proteinkinase A, die wiederum verschiedene Proteine aktiviert, die zur elektromechanischen Kopplung beitragen (v.a. L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle und Phospholamban). Dies hat auf das Herz verschiedene Effekte: die Verringerung der diastolischen zytosolischen Calciumkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_c$), positive Inotropie (Beschleunigung und Verstärkung der Kontraktion) sowie positive Lusitropie (Beschleunigung der Relaxation) (Bers 2002). Die Ursache des letztgenannten liegt in der Phosphorylierung von Phospholamban (PLB) durch die PKA, was das Abdissoziieren des Ca^{2+} von den Myofilamenten sowie dessen Rückaufnahme in das SR beschleunigt (Li, Desantiago et al. 2000). Das phosphorylierte PLB führt als Inhibitor der SERCA zudem zu einer Abnahme der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_c$ und in der Folge zu einer schnelleren Relaxation. Die positive Inotropie ist das Resultat eines erhöhten Ca^{2+} -Einstroms (I_{Ca}) und einer vermehrten Ca^{2+} -Beladung des SR (durch SERCA-Aktivierung), die zusammen mit der Sensibilisierung der RyR zu einer vermehrten systolischen SR Ca^{2+} -Freisetzung führen (Bers 2002).

Der Prozess der elektromechanischen Kopplung gewährleistet die intakte Pumpleistung des Herzens, um den Körper ausreichend mit Blut und Sauerstoff zu versorgen (Abbildung 1) (Bers 2002, Maack and O'Rourke 2007, Maack 2008).

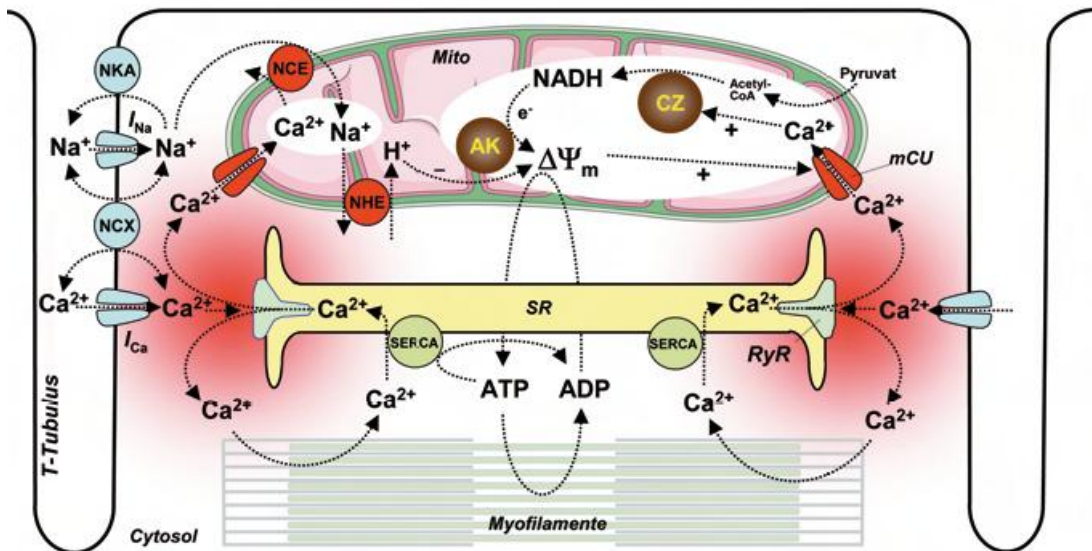


Abbildung 1: Elektromechanische Kopplung und mitochondriale Energetik. Erläuterungen siehe Text. Mito, Mitochondrien; SR, sarkoplasmatisches Retikulum; CZ, Citratzyklus; AK, Atmungskette; $\Delta\Psi_m$, mitochondriales Membranpotential; SR, sarkoplasmatisches Retikulum; SERCA, SR Ca²⁺ - ATPase; NCE, mitochondrialer Na⁺/Ca²⁺-Austauscher; NHE, mitochondrialer Na⁺/H⁺-Austauscher; NKA, sarkolemmale Na⁺/K⁺-ATPase; NCX, sarkolemmaler Na⁺/Ca²⁺-Austauscher; RyR, Ryanodinrezeptor; mCU, mitochondrialer Ca²⁺-Uniporter; I_{Na} und I_{Ca}, Ströme der spannungsabhängigen Na⁺- und Ca²⁺-Kanäle (Maack, 2008).

2.1.4 Die Physiologie der mitochondrialen Energetik

Die Energie zur Aufrechterhaltung der elektromechanischen Kopplung wird in Form von Adenosintriphosphat (ATP) bereitgestellt. Aufgrund der Tatsache, dass mit einem Herzschlag ca. 2% des pro Zelle verfügbaren ATP verbraucht wird, ist es wichtig, dass dieses schnell synthetisiert und regeneriert wird. Für diese Aufgabe sind durch die Prozesse der oxidativen Phosphorylierung die Mitochondrien verantwortlich. Diese machen mit 35% einen großen Teil des Zellvolumens aus. Die Mitochondrien stehen in enger räumlicher Beziehung zu den Ca²⁺-Kanälen des SR, sodass man annimmt, dass im Gegensatz zum restlichen Zytosol in dieser mitochondrialen Ca²⁺- Mikrodomäne während des Ca²⁺-Transienten sehr hohe Ca²⁺-Konzentrationen von etwa 10-30 $\mu\text{mol/l}$

herrschen. Diese „Hotspot-Hypothese“ (Rizzuto, Duchen et al. 2004) könnte erklären, warum es in Mitochondrien, die Ca^{2+} über den eigentlich nur gering calciumaffinen mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporter (MCU) aufnehmen, dennoch zur Ausbildung eines rapiden mitochondrialen Ca^{2+} -Transienten kommen kann (Maack 2008).

Für die oxidative Phosphorylierung der Mitochondrien kommt speziell dem Citratzyklus (TCA) eine besonders wichtige Rolle zu. Hier wird insbesondere NADH gebildet, das wiederum in die Atmungskette geschleust wird und dort als Elektronendonator fungiert, wo an den unterschiedlichen Komplexen durch Redoxreaktionen Protonen (H^+) über die innere Mitochondrienmembran in den intermembranären Spalt geschleust werden. Dadurch entstehen über der inneren Mitochondrienmembran sowohl ein Protonengradient (ΔpH) sowie das „mitochondriale Membranpotential“ ($\Delta\Psi_m$), das ungefähr -180 mV beträgt. $\Delta\Psi_m$ und ΔpH stellen die Treibkraft für die F_1/F_0 -ATPase dar, an der letztendlich aus Adenosindiphosphat (ADP) ATP gebildet wird.

Die Regulation der Atmung und somit ATP-Bildung erfolgt insbesondere durch ADP und Ca^{2+} . Wird durch erhöhte Arbeitslast viel ATP in der Zelle verbraucht, entsteht in der Folge vermehrt ADP, das den gesteigerten Energiebedarf der Zelle anzeigt und die F_1/F_0 -ATPase zur neuerlichen Bildung von ATP anregt. Dazu gelangen unter Verbrauch des Membranpotentials $\Delta\Psi_m$ Protonen über die innere Mitochondrienmembran und die F_1/F_0 -ATPase zurück in die Matrix. Da das mitochondriale Membranpotential jedoch unentbehrlich ist, müssen vermehrt Elektronen von NADH (und FADH_2) an die Atmungskette abgegeben werden, woraufhin auch dieses verbraucht und zu $\text{NAD}^+(\text{FAD})$ umgewandelt wird. Auch der Bedarf an Ca^{2+} ist bei gesteigertem Energieverbrauch erhöht, sodass vermehrt Ca^{2+} über den MCU in die Mitochondrien einströmt (Baughman, Perocchi et al. 2011, De Stefani, Raffaello et al. 2011). Calcium stimuliert dort wichtige Schlüsselenzyme des Citratzyklus, was eine schnelle Regeneration von NADH gewährleistet. Die Regulation der oxidativen Phosphorylierung durch ADP und Ca^{2+} sowie die Relationen von ATP/ADP beziehungsweise NADH/ NAD^+ (und FADH_2/FAD) sichern also die

Energiebereitstellung durch die Mitochondrien (Maack 2008, Kohlhaas and Maack 2013). Fehlregulationen der letztgenannten Mechanismen (vor allem im mitochondrialen Calciumhaushalt) scheinen mögliche Ansätze für die bis heute noch nicht endgültig verstandenen Pathomechanismen bei der Entwicklung der Herzinsuffizienz darstellen zu können.

2.1.5 Die Pathophysiologie der elektromechanischen Kopplung bei Herzinsuffizienz

Man geht davon aus, dass einen zentralen Aspekt bei der Entwicklung der Herzinsuffizienz ein gestörter zellulärer Ca^{2+} -Haushalt darstellt, aus dem eine Fehlregulation der elektromechanischen Kopplung resultiert (Maack 2008). Eine verminderte SERCA-Aktivität, eine Fehlfunktion der Ryanodinrezeptoren sowie Störungen im System der Transversaltubuli haben zur Folge, dass bei Herzinsuffizienz der Calciumgehalt im SR der Kardiomyozyten verringert ist (Bito, Heinzel et al. 2008, Lyon, MacLeod et al. 2009, Heinzel, MacQuaide et al. 2011, Kohlhaas and Maack 2013). Aufgrund dessen stehen dem Herzen während der Systole weniger Ca^{2+} -Ionen zur Verfügung, woraufhin die Ca^{2+} -induzierte Kontraktion der Myofilamente deutlich vermindert ausfällt (Maack 2008).

Eine weitere wichtige Komponente des Pathomechanismus der Herzinsuffizienz stellt die Erhöhung der zytosolischen Natrium-Konzentration ($[\text{Na}^+]_i$) dar. Diese ist vermutlich die Folge einer vermehrten Aktivität des „späten Natriumeinstromes“ (I_{Na}) sowie des Na^+/H^+ -Austauschers (Despa, Islam et al. 2002, Pieske, Maier et al. 2002, Baartscheer, Schumacher et al. 2003, Pieske and Houser 2003, O'Rourke and Maack 2007). Darüber hinaus wird die Expression des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers (NCX) heraufreguliert, der normalerweise für den Calcium-Efflux aus der Zelle verantwortlich ist. Da aber intrazellulär vermehrt Natrium vorhanden ist, kann während des Aktionspotenzials im Austausch für Na^+ vermehrt Ca^{2+} in die Zelle geschleust werden (Despa, Islam et al. 2002, Pieske, Maier et al. 2002). Dies kann die oben beschriebene Verringerung der SR Ca^{2+} -Beladung bei Herzinsuffizienz teilweise kompensieren (Armoundas, Hobai et al. 2003, Baartscheer,

Schumacher et al. 2003, Piacentino, Weber et al. 2003, Weber, Piacentino et al. 2003, Weisser-Thomas, Piacentino et al. 2003, Bers 2006, Maack 2008)

Jedoch ist dieser Mechanismus nicht nur von Vorteil. Im Hinblick auf die mitochondriale Energetik der Zellen scheint sich eine erhöhte zytosolische Natriumkonzentration nachteilig auszuwirken. Über den mitochondrialen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (mNCE) wird Calcium aus den Mitochondrien geschleust; die mitochondriale Ca^{2+} -Akkumulation nimmt ab, obwohl diese bei einem Arbeitslastwechsel obligat für die Stimulation von Citratzyklus-Enzymen und somit für die oxidative Phosphorylierung ist (Maack 2008). Ein wichtiger Pathomechanismus der Herzinsuffizienz ist darüber hinaus eine chronisch erhöhte β -adrenerge Stimulation der Herzmuskelzellen. Die Regulation der Phosphorylierung Ca^{2+} -modulierender Proteine durch PKA und CaMKII ist also gestört. Insbesondere in der vermehrten CaMKII-Aktivierung könnte die Ursache für den vermehrten späten Natriumeinstrom I_{Na} sowie das Leck der Ryanodinrezeptoren liegen (Maier and Bers 2007, Grimm and Brown 2010). Man geht davon aus, dass diese zentrale Fehlfunktion bei der elektromechanischen Kopplung einen wichtigen Beitrag zur Entwicklung eines energetischen Defizites (Ingwall and Weiss 2004, Weiss, Gerstenblith et al. 2005) sowie der Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (Li, Huang et al. 1995, Giordano 2005) leistet, welche eine bedeutende Rolle bei der weiteren Progression der Herzinsuffizienz spielen (Abbildung 2 und 2.1.12).

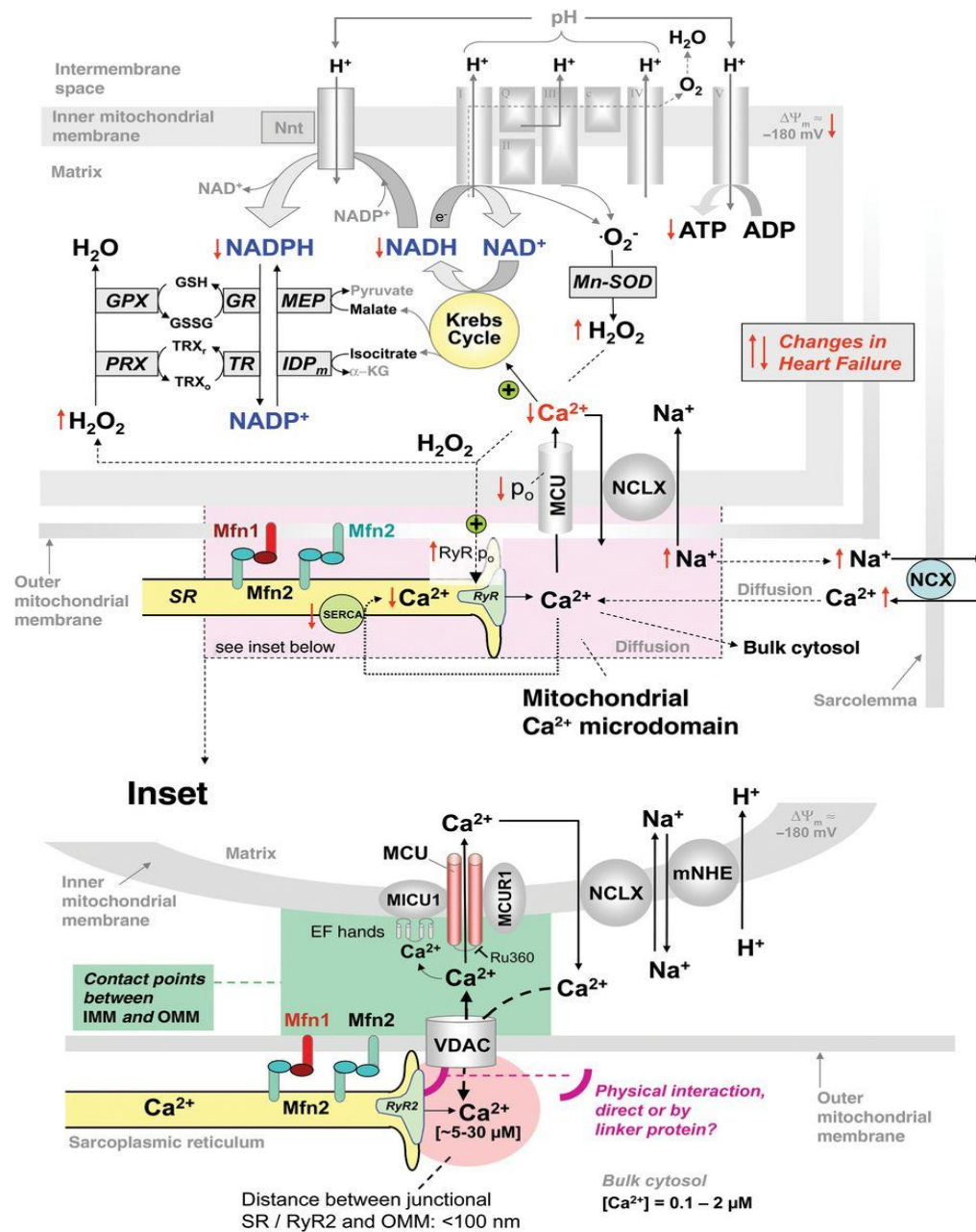


Abbildung 2: Physiologie und Pathophysiologie im Zusammenspiel von elektromechanischer Kopplung, mitochondrialer Energetik sowie oxidativem Stress in Kardiomyozyten.

Erläuterungen siehe Text. Die Veränderungen bei der Herzinsuffizienz sind mit roten Pfeilen gekennzeichnet. $\Delta\Psi_m$, mitochondriales Membranpotential; Mn-SOD, Mangan (Mn^{2+})-abhängige Superoxiddismutase; PRX, Peroxiredoxin; TR, Thioredoxinreduktase; TRXr/o, reduziertes/oxidiertes Thioredoxin; GPX, Glutathionperoxidase; GR, Glutathionreduktase; GSH/GSSG, reduziertes/oxidiertes Glutathion; α -KG, α -Ketoglutarat; MCU, mitochondrialer Ca^{2+} -Uniporter; NCLX, mitochondrialer Na^+/Ca^{2+} (und Li^+)-Austauscher; p_o , Öffnungswahrscheinlichkeit; RyR, Ryanodinrezeptor; SERCA, SR Ca^{2+} -ATPase; Mfn, Mitofusin. Unter „Inset“ sind die detaillierten Vorgänge im Bereich einer Calcium-Mikrodomäne dargestellt. MICU1, mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme 1; mNHE, mitochondrialer Na^+/H^+ -Austauscher; IMM, innere mitochondriale Membran; OMM, äußere mitochondriale Membran; VDAC, spannungsabhängiger Anionenkanal (Kohlhaas&Maack 2011) (Kohlhaas and Maack 2013).

2.1.6 Der Eisenstoffwechsel im menschlichen Körper

Dysregulationen des Eisenhaushaltes stellen Ursachen vieler Erkrankungen dar. Hierbei kann es sowohl zu einem Überangebot oder einem Mangel an Eisen kommen. Aus diesem Grunde ist es wichtig, die Mechanismen und Regulationswege des Eisenstoffwechsels genau zu kennen, um eisenspezifische Erkrankungen frühzeitig zu erkennen sowie therapeutisch intervenieren zu können.

Eisen ist ein wichtiger Bestandteil vieler metabolischer Prozesse sowohl im Organismus als auch auf zellulärer Ebene (Hentze, Muckenthaler et al. 2010). Im Organismus unterscheidet man bezüglich des Eisenhaushaltes vier Fraktionen: mit etwa 70% stellt das an Hämoglobin gebundene Eisen den größten Anteil dar, während das Depoteisen in Form von Ferritin und Hämosiderin etwa 18% ausmachen; der als Funktionseisen zusammengefasste Anteil von Myoglobin und eisenhaltiger Enzyme beträgt etwa 12%, und das im Körper zirkulierende, an Transferrin gebundene „Transporteisen“ fällt lediglich mit etwa 0,1% ins Gewicht (Herold 2013).

Eisen kann zwei verschiedene Redoxstatus einnehmen und somit entweder in Form von zweiwertigem (Fe^{2+}) oder dreiwertigem Eisen (Fe^{3+}) als Kofaktor fungieren oder als Katalysator an verschiedenen biochemischen Reaktionen teilnehmen (Kell 2009, Jankowska, von Haehling et al. 2013). Zunächst werden etwa 5-15% des mit der Nahrung aufgenommenen dreiwertigen Eisens (Fe^{3+}) im Bürstensaum des Darmepithels mithilfe des apikal membranständigen enterozytären Enzyms Ferrireduktase (DyctB) zu zweiwertigem Eisen (Fe^{2+}) reduziert. Dies ist ein wichtiger Schritt, da nur Fe^{2+} über den „divalent metal transporter 1“ (DMT1) in das Zellinnere der Enterozyten gelangen kann (Gunshin, Mackenzie et al. 1997). Hier werden die Eisenionen mit Apoferritin zu Ferritin komplexiert, welches die Speicherform des Eisens im Körper darstellt. Die Aufnahme des Häm-Eisens in die Enterozyten erfolgt hingegen über bisher nicht ganz verstandene Mechanismen, möglicherweise über das „heme carrier protein 1“ (HCP1); der bislang von Qiu et al. postulierte Transporter SLC46A1 scheint nach

aktueller Wissenslage vor allem Folate zu transportieren (Qiu, Jansen et al. 2006). Nach Aufnahme in die Mukosazelle wird das Häm im endoplasmatischen Retikulum durch die Hämoxygenase-1 (HOX1) zu Fe^{2+} und Porphobilinogen umgesetzt (Ferris, Jaffrey et al. 1999). Sowohl Ferritin als auch Häm-Eisen haben einen vergleichbaren Export aus den Enterozyten; am basolateralen Zellpol erfolgt die Sezernierung in den Extrazellulärraum durch Ferroportin (Donovan, Brownlie et al. 2000, McKie, Marciani et al. 2000). Hierbei spielt das Enzym Hephaestin, eine Coeruloplasmin-ähnliche Oxidase, eine wichtige Rolle. Diese bedingt die Oxidation von Fe^{2+} zu Fe^{3+} , da der Transport von Eisen im Körper durch das Glykoprotein Transferrin erfolgt, welches lediglich dreiwertiges Eisen hochaffin bindet (Hentze, Muckenthaler et al. 2010). Dieses sogenannte Plasma-Eisen bindet an den Transferrinrezeptor 1 (TfR1) der Zielzellen und wird schließlich über rezeptorgesteuerte Endozytose in diese aufgenommen (Anderson, Frazer et al. 2009, Anderson and Vulpe 2009, Zhang and Enns 2009, Hentze, Muckenthaler et al. 2010, Munoz, Garcia-Erce et al. 2011). In diesen Zielgeweben, die sich zu gleichen Dritteln durch die retikulohistiozytären Systeme (RHS) der Leber, des Knochenmarks und der Milz sowie anderer Gewebe zusammensetzen, wird es nun als Speichereisen entweder in Gestalt des wasserlöslichen Ferritins oder als wasserunlösliches Hämosiderin gelagert, bis ihm eine weitere Verwendung zukommt (Herold 2013). Die verschiedenen Eisenpools interagieren je nach Stoffwechsellage miteinander (Anderson, Frazer et al. 2009, Anderson and Vulpe 2009, Zhang and Enns 2009, Hentze, Muckenthaler et al. 2010, Munoz, Garcia-Erce et al. 2011, Wang and Pantopoulos 2011).

Aufgrund der Tatsache, dass der menschliche Körper weder zur Produktion noch zur aktiven Ausscheidung des Eisens imstande ist, bedient sich der Organismus dreier wichtiger Mechanismen, um die Integrität des Eisenhaushaltes zu gewährleisten. Zunächst erfolgt ein Teil der Regulation der Eisenhomöostase durch die Rückgewinnung des Funktions-Eisens sowie des freigesetzten Hämeisens durch die Makrophagen des retikulohistiozytären Systems (RHS), woraufhin es entweder wieder an

Transferrin gebunden oder als Ferritin/Hämosiderin gespeichert wird (Herold 2013) (Abbildung 3).

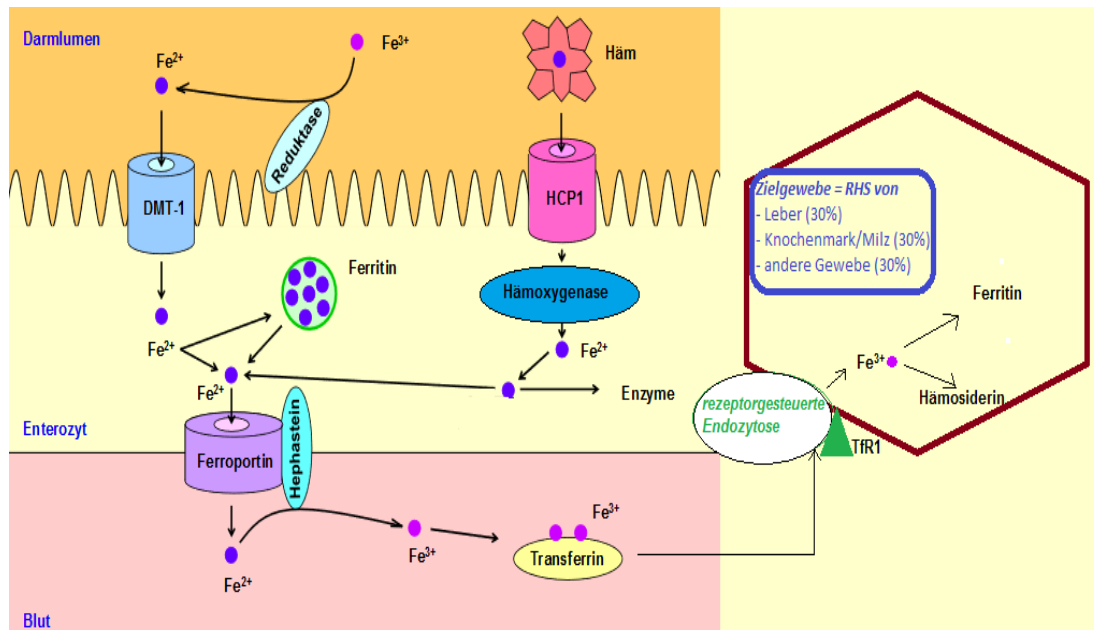


Abbildung 3: Eisenstoffwechsel im menschlichen Körper.

Vereinfachte Darstellung, Erläuterungen siehe Text. Reduktase, Ferrireduktase; DMT-1, divalent metal transporter 1; HCP1, heme carrier protein 1; TFR1, Transferrinrezeptor 1; RHS, retikulohistiozytäres System. Modifizierte Abbildung. (Hastka J. 2011).

Weiterhin ist die oben geschilderte intestinale Resorption von großer Bedeutung. Im Normalfall werden täglich lediglich 1-2 mg Eisen absorbiert; im Falle eines Eisenmangels (beispielsweise physiologisch durch Schuppung der Haut und Blutungen, oder aber hervorgerufen durch eine Schwangerschaft oder eine gesteigerte Erythropoese) wie auch im Falle eines Eisenüberschusses (beispielsweise durch eine erfolgte Bluttransfusion) kann die systemische Eisenabsorption durch die Enterozyten je nach Bedarf erhöht oder erniedrigt werden (Hentze, Muckenthaler et al. 2010). Diese Feinjustierung der intestinalen Resorption erfolgt durch das in den Hepatozyten synthetisierte Hormon Hepcidin (siehe 2.1.7) sowie den bereits genannten Eisenexporter Ferroportin (Herold 2013). Zuletzt ist die Kontrolle der Eisenhomöostase auf zellulärer Ebene zu nennen, wo die Signalwege über die sogenannten „iron-regulatory proteins“ (IRP1/2) gesteuert werden, welche an die „iron-responsive elements“ (IRE) der mRNAs binden (siehe 2.1.8) (Hentze, Muckenthaler et al. 2010). Jeder der drei genannten

Kontrollmechanismen unterliegt seinerseits wiederum unterschiedlichen Signalkaskaden, die je nach Stoffwechsellaage des Organismus in Kraft treten.

2.1.7 Systemische Regulation der Eisenhomöostase über das Hormon Hepcidin

Das Peptidhormon Hepcidin wird von Hepatozyten ausgeschüttet und zirkuliert im Plasma an α 2-Makroglobulin gebunden (Peslova, Petrak et al. 2009). Es wird über die Niere ausgeschieden oder zusammen mit Ferroportin abgebaut (Jordan, Poppe et al. 2009), an das es über die Januskinase 2 (Jak2) an der Oberfläche eisensensitiver Zellen bindet (De Domenico, Lo et al. 2009). Hepcidin triggert nach erfolgter Bindung an Ferroportin die Internalisierung der Januskinase 2 in diese eisensensitiven Zellen, woraus die verminderte Expression der zur Eisenaufnahme in die Enterozyten notwendigen Enzyme (siehe 2.1.6) resultiert (Hentze, Muckenthaler et al. 2010). Somit reduziert Hepcidin im Organismus die intestinale Eisenresorption und bedingt weiterhin die Aufnahme von Eisen in das retikuloendotheliale System (Handelman and Levin 2008, Kemna, Tjalsma et al. 2008). Die hepatozytäre Hepcidinsynthese selbst wird je nach Stoffwechsellaage und dem daraus resultierenden variablen Eisenbedarf der Zielgewebe über verschiedene Signale reguliert. Hierbei stellen beispielsweise reduzierte Eisenbestände, eine insuffiziente erythropoetische Aktivität oder Hypoxie Stimuli für eine reduzierte Hepcidinausschüttung dar, wohingegen etwa ein inflammatorischer Prozess diese hochreguliert (Babitt and Lin 2010, Hentze, Muckenthaler et al. 2010, Wang and Pantopoulos 2011).

2.1.8 Zelluläre Regulation der Eisenhomöostase über IRP1/IRP2

Die „iron-regulatory proteins“ (IRP1/IRP2; auch: ACO1 (=Aconitase 1) oder IREB2) koordinieren den Eisenhaushalt auf zellulärer Ebene. Hierfür

interagieren die beiden Proteine mit (cis-regulatorischen) Haarnadelstrukturen, sogenannten „iron-responsive elements“ (IRE), die am 5'- oder 3'-Ende der untranslatierten Regionen (UTR) der Target-mRNA lokalisiert sind. Hier modulieren sie je nach Eisenangebot im Organismus unter anderem die Translation von Ferritin, die der Transferrin-Rezeptoren (TfR) oder die der mitochondrialen Aconitase (ACO2). Im Falle niedriger Eisenlevel binden die IRP hochaffin an die 3' UTR IRE der Transferrinrezeptor-mRNA, woraufhin letztere ihre Degradation verhindert, die Rezeptorproteinsynthese hochreguliert wird und die Synthese der TfR steigt (Muckenthaler, Galy et al. 2008, Recalcati, Minotti et al. 2010). Auch die DMT1-Synthese scheint auf diese Weise reguliert zu werden. Liegt nun umgekehrt ein Eisenüberschuss vor, kehren sich die oben genannten Mechanismen um: einerseits binden die IRP nun nicht mehr an die IRE, wodurch die Ferritinbildung induziert wird. Darüber hinaus interagiert IRP2 (sowie apo-IRP1, siehe unten) mit dem sogenannten regulatorischen F-box and leucine-rich repeat protein 5 (FBXL5). Dieses verfügt über eine hemerythrinähnliche Domäne, welche als Eisensensor fungiert: so wird durch die direkte Anwesenheit und Bindung von Eisen an diese Domäne FBXL5 stabilisiert. Dieses bildet einen SKP1-CUL1-F-box (SCF) E3-Ligasekomplex. Daraufhin wird erst die Ubiquitinierung des IRP und in der Folge dessen Degradation durch zelleigene Proteasomen induziert, wodurch auch die Degradation der TfR-mRNA nicht mehr verhindert wird, sodass die Transferrinrezeptorsynthese gesenkt wird (Muckenthaler, Galy et al. 2008, Salahudeen, Thompson et al. 2009, Vashisht, Zumbrennen et al. 2009, Hentze, Muckenthaler et al. 2010, Recalcati, Minotti et al. 2010).

Das je nach Eisenbeladung der Zellen unterschiedliche Bindungsverhalten von IRP1 ist auf einen eigenen Regulationsmechanismus zurückzuführen. Ist reichlich Eisen vorhanden, bindet IRP1 ein würfelförmiges Eisen-Schwefel-Cluster (4Fe-4S-Cluster, siehe 2.1.9), das wiederum eine Bindung von IRP1 an ein IRE verhindert (Walden, Selezneva et al. 2006, Muckenthaler, Galy et al. 2008). Der 4Fe-4S-IRP1-Komplex fungiert zudem als zytosolische Aconitase. In diesem Zustand spricht man auch von holo-IRP1. In eisendefizienten Zellen gehen sowohl der 4Fe-4S-IRP1-Komplex wie auch

die Funktionalität als Aconitase verloren; IRP1 liegt nun wieder als apo-IRP1 vor und die Bindung an die IRE ist wieder möglich (Hentze, Muckenthaler et al. 2010). Die genauen molekularen Vorgänge in Bezug auf diese Cluster-Bindung sind noch nicht vollständig verstanden, jedoch konnte gezeigt werden, dass eine Unterbrechung dieses Mechanismus die IRP1-IRE-Bindung stimuliert (Sheftel and Lill 2009). Zudem vermutet man derzeit, dass der Wechsel zwischen apo- und holo-IRP1 vom mitochondrialen Eisenangebot abhängt, während IRP2 vor allem vom zytosolischen Eisenlevel abhängig ist (Hentze, Muckenthaler et al. 2010). Auch die Reaktionen auf ein Eisendefizit differieren zwischen IRP1 und IRP2. Während beispielsweise im Falle einer Hypoxie IRP1 in seiner „inaktivierten“ holo-Form vorliegt, wird IRP2 aufgrund des Sauerstoffbedarfs für die FBXL5-Degradation stabilisiert. Darüber hinaus wird durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) selektiv nur IRP1 aktiviert, indem ROS die Fe/S-Cluster zerstören (Pantopoulos and Hentze 1998). Auch Phosphorylierungen können IRP1 und IRP2 in ihren Aktivitäten modulieren. Wenngleich die Vorgänge und Regulationsmechanismen noch nicht vollständig verstanden sind, ist ein enges Zusammenspiel des IRP1/IRP2-Systems obligat, um den intakten Eisenhaushalt der Zelle zu gewährleisten (Hentze, Muckenthaler et al. 2010).

2.1.9 Die Rolle von Eisen in Mitochondrien

Die Mitochondrien leisten über die Verarbeitung des Eisens einen immens wichtigen zellbiologischen Beitrag für den Organismus. Hierbei steht die Bildung zweier bestimmter bioaktiver prosthetischer Gruppen im Vordergrund: die Hämbiosynthese sowie die Synthese der Eisen-Schwefel-Cluster (ISC). Häm sowie die ISC werden sowohl vom Mitochondrium selbst wie auch von der gesamten Zelle benötigt (Levi and Rovida 2009, Sheftel and Lill 2009).

Der größte Teil des täglich vom Körper recycelten Eisens wird zur Hämoglobinsynthese verwendet. Diese findet hauptsächlich in den

Mitochondrien der Erythroblasten statt. Die Aufnahme von Eisen in die Erythroblasten selbst erfolgt über den Transferrinrezeptor TfR (Hentze, Muckenthaler et al. 2010). Anschließend wird das Eisen über das in der inneren Mitochondrienmembran gelegene Protein Mitoferrin 1 (Mfrn1) in das Zellorganell eingeschleust (Shaw, Cope et al. 2006). Hierbei wird Mitoferrin 1 durch das sogenannte ATP-binding cassette (ABCB10)- Protein stabilisiert, was diesen Prozess erleichtert (Chen, Paradkar et al. 2009). Ist Eisen in die Zelle gelangt, kann die Hämbiosynthese beginnen. Der letzte Schritt selbiger beinhaltet schließlich die Übertragung eines Fe^{2+} durch das Enzym Ferrochelatase auf den unmittelbaren Vorgänger von Häm, Protoporphyrin IX. Dessen Synthese selbst ist an die aktuelle Eisenverfügbarkeit im Mitochondrium gekoppelt: die δ -Aminolaevulinat-Synthase 2 (ALAS2), das erste Enzym der Protoporphyrin IX-Synthese, wird in Anwesenheit von Eisen über das IRP/IRE-System posttranskriptionell reguliert. Eisen ist also obligat, um die Hämbiosynthese in Gang zu setzen. Liegt in den Mitochondrien ein Eisenmangel vor und ist zudem das Vorhandensein der Ferrochelatase vermindert, ist die Hämbiosynthese stark gestört (Ajioka, Phillips et al. 2006). Sind die Tiere beispielsweise durch ein Fehlen von TfR1 gar nicht erst zur Eisenaufnahme in die Erythroblasten imstande, sterben sie aufgrund einer schweren Anämie (Hentze, Muckenthaler et al. 2010). Eine verminderte Aktivität der ALAS2 zieht die Entwicklung einer sideroblastischen Anämie nach sich, während Haploinsuffizienzen der anderen Enzyme zur Hämbiosynthese durch die Akkumulation toxischer Häm-Vorstufen Porphyrien verursachen (Puy, Gouya et al. 2010).

Eine weitere wichtige Rolle kommt der Verwendung des Eisens durch Mitochondrien zur Bildung der Eisen-Schwefel-Cluster (ISC; 4Fe-4S- oder 2Fe-2S-Cluster) zu, die anorganische Cofaktoren für die Eisen-Schwefel-Proteine darstellen und die für die Atmungskette und den Citratzyklus benötigt werden (Lill 2003). Die Bildung der Cluster erfolgt zunächst durch die Abspaltung eines Schwefelatoms aus Cystein durch die Cysteindesulfurase Nfs1. Dieses Schwefelatom wird nun unter Bildung eines Persulfids auf einen konservierten Cysteinrest des Nfs1 übertragen (Kaiser, Clausen et al. 2000), ehe es dann auf die Proteine Isu1/Isu2 überführt wird.

Letztere fungieren als Gerüst für die Bildung eines 2Fe-2S-Clusters zusammen mit den in den Matrixraum transportierten Eisenionen. 2Fe-2S-Cluster und 4Fe-4S-Cluster können dimerisieren (Yuvaniyama, Agar et al. 2000). Von besonderer Bedeutung bei der Bindung der Isu-Proteine mit den Eisenionen ist das Vorhandensein des Matrixproteins Yfh1 (yeast frataxin homolog) (Muhlenhoff, Richhardt et al. 2002). Daraufhin werden die ISC in Apoproteine eingebaut und reifen über weitere Modulierungen zu Eisen-Schwefel-Proteinen heran (Lill 2003).

Auch für die Funktion des Citratzyklus (TCA) ist das Vorhandensein von Eisen unentbehrlich, enthalten doch verschiedene TCA-Enzyme Eisen-Schwefel-Cluster-Gerüstproteine. Als wichtigster Vertreter ist hier das Enzym Aconitase zu nennen. Im Organismus liegt die Aconitase in zwei Formen vor. Als zytosolische c-Aconitase/IRP1 spielt es eine exorbitant wichtige Rolle in der Regulation des Eisenhaushaltes (siehe 2.1.8). Im mitochondrialen Citratzyklus katalysiert es in Form der m-aconitase die Dehydratation von Citrat zu cis-Aconitat und dessen Hydratation zu Isocitrat (Tong and Rouault 2007). Zudem geht man davon aus, dass die Aconitase unabhängig von ihrer enzymatischen Funktion auch an der Erhaltung und der Stabilisierung der mitochondrialen DNA beteiligt ist (Chen, Wang et al. 2005). Aufgrund der Tatsache, dass die Aconitase über ihre katalytische Komponente hinaus noch andere unterschiedliche Funktionalitäten aufweist, wird sie auch als ein sogenanntes „moonlight enzyme“ angesehen (Jeffery 2009). Die Aconitase ist zudem ein sehr stresssensitives Enzym und wird oft als Marker für oxidativen Stress untersucht (siehe 2.1.13).

2.1.10 Die Rolle eines Eisenmangels bei chronischer Herzinsuffizienz und anderen Krankheitsbildern

Nach aktueller Datenlage ist bis heute noch nicht vollends geklärt, welches letztendlich die genauen Pathomechanismen sind, die der Entwicklung der Herzinsuffizienz zugrunde liegen. Weithin bekannt ist jedoch, dass Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz häufig einen Eisenmangel sowie eine

Anämie zeigen, wobei letztere häufig aus dem Eisenmangel resultiert. Nanas et al. untersuchten in ihrer Studie die Genese der Anämie von Patienten, welche an einer fortgeschrittenen chronischen Herzinsuffizienz litten (NYHA IV; LVEF: 22%). In 73% der Fälle zeigten die Knochenmarkbiopsien einen Eisenmangel als Ursache der Anämie. Die MCV-, MCH- sowie Serumferritin-Level dieser Patienten waren signifikant niedriger als die der Herzinsuffizienz-Patienten ohne Anämie (Nanas, Matsouka et al. 2006). Die Anämie ist Folge einer Kaskade, deren Ursprung bei einer für die Herzinsuffizienz typischen chronischen Inflammationsreaktion liegt. Im Zuge dieser Inflammation werden vermehrt Zytokine ausgeschüttet, welche einerseits die intestinale Resorption von Eisen verhindern sowie andererseits die Eisenfreisetzung inhibieren und Eisen stattdessen in das retikuloendotheliale System umlenken, was als retikuloendothelialer Block bezeichnet wird (Weiss and Goodnough 2005). Hierbei scheint vor allem das als Antwort auf die proinflammatorischen Zytokine ausgeschüttete Hepcidin eine Schlüsselrolle in der Kontrolle dieses Prozesses zu spielen (Kemna, Tjalsma et al. 2008, Viatte and Vaulont 2009). Konsekutiv sind auch die Erythropoetinsynthese und in der Konsequenz die Überlebensdauer der Erythrozyten vermindert, was zur Anämie führt. Infolgedessen ist der Sauerstofftransport in die Peripherie vermindert und der oxidative Stress steigt.

Die O₂-Versorgung der Gewebe ist ebenfalls nicht gewährleistet, wenn zwar zunächst keine Anämie, aber dennoch ein Eisenmangel vorliegt. Auch dann sind eine verringerte Hämoglobinkonzentration sowie eine verminderte Produktion anaerober Enzyme und somit ein gestörter Sauerstoffhaushalt die Folge (Willis and Dallman 1989, Nanas, Matsouka et al. 2006). Jankowska et al. beobachteten in ihrer Studie die Auswirkungen der Eisendefizienz auf Herzinsuffizienz-Patienten sowie deren klinischen Verlauf (Jankowska, Rozentryt et al. 2010). Diese Patienten zeigten Einbußen in ihrer physischen Konstitution sowie ihrer körperlichen Belastbarkeit (Haas and Brownlie 2001). Darüber hinaus war ein Eisenmangel mit einer erhöhten Sterblichkeit sowie einer höheren Wahrscheinlichkeit für eine Herztransplantation vergesellschaftet. Dies galt auch, wenn die Patienten lediglich einen

Eisenmangel aufwiesen und nicht zusätzlich eine Anämie (Jankowska, Rozentryt et al. 2010). Diese Beobachtungen warfen die Frage auf, ob bei dieser Patientengruppe eine Eisensubstitution eine Verbesserung der Symptomatik sowie einen besseren klinischen Verlauf bewirken würde. Anker et al. untersuchten daher die Auswirkung einer 24-wöchigen intravenösen Gabe von 200 mg Eisencarboxymaltose, eines polynukleären Eisenkomplexes, auf Patienten mit systolischer Herzinsuffizienz sowie Eisenmangel mit oder ohne begleitende Anämie (Anker, Comin Colet et al. 2009). Von allen 459 Patienten, die Eisencarboxymaltose erhalten hatten, berichteten 50% eine starke oder moderate Verbesserung ihrer Symptomatik. Dabei waren die Ergebnisse unabhängig vom Vorhandensein einer Anämie. Die deutlichsten Verbesserungen nach 24 Wochen waren hinsichtlich der körperlichen Belastbarkeit beim 6-Minuten-Gehtest und somit der NYHA-Klasse der Patienten sowie bei den Angaben zur Lebensqualität zu verzeichnen. Aufgrund der Tatsache, dass sowohl anämische als auch nicht-anämische Patienten von der Eisengabe profitierten, scheint ein Eisenmangel wohl einen validen und unabhängigen Faktor darzustellen, dessen Behandlung sich als wichtiger Therapieansatz für Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz etablieren könnte (Anker, Comin Colet et al. 2009).

Während sich ein Eisenmangel also negativ auf den Organismus auszuwirken scheint, ist auch eine Überladung des Körpers mit Eisen problematisch. So geht man beispielsweise davon aus, dass es bei der Parkinson-Krankheit zu einer Akkumulation von Eisen in der Substantia nigra kommt, wenngleich der Pathomechanismus dieses Phänomens bis heute noch nicht ganz verstanden ist (Mastroberardino, Hoffman et al. 2009). Beim Krankheitsbild der Hämochromatose sind Eisenresorption und –ablagerung in den Parenchymzellen von Leber, Pankreas, Myokard oder anderen Organen erhöht. Dies kann entweder aus Transfusionen resultieren oder ist Folge einer hochregulierten Eisenresorption infolge einer C282Y-Mutation im HFE-Gen. Die Körpereisenbestände können konsekutiv auf das fünf- oder zehnfache des Normwertes erhöht sein (Herold 2013). Das freie reaktive Eisen führt zur Schädigung von Zellen und Organen (Lipinski, Starzynski et

al. 2005). Als häufigste Organmanifestationen werden Leberzirrhosen und das sich daraus entwickelnde hepatozelluläre Karzinom sowie der Diabetes mellitus beobachtet (Herold 2013). Bei Patienten, die an dem Krankheitsbild der Friedreich Ataxie leiden, welches sich häufig in Gestalt einer dilatativen Kardiomyopathie manifestiert, ist das Matrixprotein Frataxin (siehe 2.1.9) entweder verringert oder fehlt ganz (Puccio and Koenig 2000). Dadurch kann das eigentlich für die Eisen-Schwefel-Cluster-Bildung vorgesehene, ins Mitochondrium aufgenommene Eisen nicht weiter verwendet werden und akkumuliert stattdessen (Galy, Ferring-Appel et al. 2010). Diese Überladung mit Eisen führt durch die ablaufende Fenton-Reaktion zur ROS-Bildung und könnte ebenfalls einen der Pathomechanismen bei der Entwicklung der Herzinsuffizienz darstellen (Ichikawa, Bayeva et al. 2012, Bayeva, Gheorghiade et al. 2013). Ardehali et al. beobachteten in einer aktuellen Studie, dass die Kardiomyozyten von Herzinsuffizienz-Patienten bei einem systemischen Eisenmangel und reduzierten zytosolischen Eisenlevel (Jankowska, Rozentryt et al. 2010, Jankowska, Malyszko et al. 2013) dennoch einen erstaunlich hohen Eisengehalt der Mitochondrien sowie eine erhöhte Aktivität der die Hämbiosynthese regulierenden δ -Aminolaevulinat-Synthase 2 (ALAS2, siehe 2.1.9) aufwiesen (Khechaduri, Bayeva et al. 2013). Ardehali et. al. vermuteten hier eine Art Gegenregulation: aufgrund der bei Herzinsuffizienz herrschenden chronischen kardiomyozytären Hypoxie erfolgt die Hochregulation der ALAS2-Aktivität und somit der kardialen Häm-Level, was nachgewiesenermaßen zu gesteigerter mitochondrialer ROS-Produktion und Zelltod führte (Khechaduri, Bayeva et al. 2013). Diese Gegenregulation könnte also zum kardialen Remodeling bei der Herzinsuffizienz beitragen. Der Genese letzterer scheint demnach eine Fehlverteilung des Eisens in den Mitochondrien zugrunde zu liegen (Hohl, Ardehali et al. 2014).

2.1.11 Die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) spielen eine wichtige Rolle in zahlreichen physiologischen wie auch pathologischen Prozessen im Organismus

(Burgoyne, Mongue-Din et al. 2012). Eine der wichtigsten Quellen der ROS ist das Mitochondrium (Turrens 2003, Adam-Vizi 2005, Balaban, Nemoto et al. 2005, Murphy 2009). Man vermutet, dass im Falle einer Dysbalance zwischen ROS-Produktion und -Elimination die Entwicklung beispielsweise einer kardialen Hypertrophie oder auch einer Herzinsuffizienz gefördert wird (Moens, Takimoto et al. 2008, Dai, Hsieh et al. 2012).

In den Mitochondrien laufen Citratzyklus sowie die Atmungskette ab. Hier wird in einem engen Zusammenspiel ATP produziert, das als wichtiger Energieträger für die Pumpleistung des Herzens unbedingt gebraucht wird (siehe 2.1.4). An der Atmungskette entsteht jedoch auch Superoxid ($\bullet\text{O}_2^-$) durch unvollständige Reduktion von Sauerstoff, vor allem an Komplex I und III (Murphy 2009). Wird durch eine verstärkte Atmung eine hohe ADP-Konzentration im Zytosol und somit ein erhöhter Energiebedarf der Zelle angezeigt, wird der Elektronenfluss an der Atmungskette erhöht und in der Folge steigt auch der O_2 -Verbrauch. Dies wird auch als „state 3 Atmung“ bezeichnet. Die Atmungskette ist bei der physiologischen state 3 Atmung vermehrt oxidiert, weswegen ihr Redoxpotential sinkt und somit auch aus O_2 weniger $\bullet\text{O}_2^-$ -Radikale gebildet werden (Balaban, Nemoto et al. 2005). Letztere werden über die Mangan-abhängige Superoxiddismutase (Mn-SOD) zu H_2O_2 umgewandelt, welches dann über die Glutathionperoxidase (GPX) sowie Peroxiredoxin (PRX) zu Wasser (H_2O) transformiert wird. GPX und PRX werden durch Glutathion (GSH) und TRX (Thioredoxin) regeneriert (Ying 2008, Aon, Stanley et al. 2012), welche wiederum von NADPH reduziert werden. Dieses NADPH stammt von Enzymen, welche ihre Substrate aus dem Citratzyklus beziehen: die NADP^+ -abhängige Isocitratdehydrogenase (IDP_m), die Malatdehydrogenase sowie die Nicotinamid-Nukleotid-Transhydrogenase (Nnt) (Ying 2008). Dies wird auch als „Redox-optimiertes ROS-Gleichgewicht“ bezeichnet. Dieses antioxidative System ist jedoch limitiert, da bei vermehrter Oxidation von NADH die Regeneration von NADPH und somit die von GPX und PRX verringert sind (Abbildung 2) (Nickel, Kohlhaas et al. 2014).

2.1.12 Die Rolle von ROS bei Herzinsuffizienz

Bei der systolischen Herzinsuffizienz liegt der kontraktilen Dysfunktion eine Störung der elektromechanischen Kopplung unmittelbar zugrunde. Hierbei sind insbesondere die reduzierte SR Ca^{2+} -Freisetzung und die erhöhte zytosolische Na^+ -Konzentration ($[\text{Na}^+]_i$) entscheidende pathologische Veränderungen (siehe 2.1.5) (Houser and Margulies 2003, Bers 2006). Beide Prozesse reduzieren die steady-state Konzentrationen des mitochondrialen Ca^{2+} , welches allerdings wichtig für die Stimulation von Citratzyklus-Enzymen und somit für die oxidative Phosphorylierung ist. Die Citratzyklus-Enzyme sind für die Regeneration von NADH verantwortlich, welches wiederum zur ATP-Gewinnung an der Atmungskette gebraucht wird (siehe 2.1.4). Hier könnte die Ursache für das zelluläre Energie-Defizit bei Patienten mit Herzinsuffizienz liegen (Weiss, Gerstenblith et al. 2005, Neubauer 2007). Aufgrund der Tatsache, dass NADH neben Isocitrat und Malat ebenfalls zur Regeneration der antioxidativen Enzyme Glutathionperoxidase und Peroxiredoxin durch NADPH dient, führen die verminderte mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme sowie die Erhöhung von $[\text{Na}^+]_i$ letztendlich über die insuffiziente NADH-Regeneration auch zur erhöhten H_2O_2 -Emission und somit zu oxidativem Stress (Abbildung 2) (Kohlhaas, Liu et al. 2010, Bay, Kohlhaas et al. 2013, Gauthier, Greenstein et al. 2013). Die gesteigerte ROS-Produktion beeinflusst ihrerseits wieder die elektromechanische Kopplung, wodurch eine Art Teufelskreis entsteht, werden doch durch direkte posttranslationale Veränderungen von Ionenkanälen und von Sarkomerproteinen (Steinberg 2013, Wagner, Rokita et al. 2013) sowie durch Aktivierung von Proteinkinase A (Brennan, Bardswell et al. 2006), Proteinkinase C (Gopalakrishna and Anderson 1989) und CaMKII (Erickson, Joiner et al. 2008) der Ca^{2+} - sowie Na^+ -Haushalt im Gegenzug wiederum ungünstig beeinflusst. Bei Herzinsuffizienz ist die Aktivität der CaMKII erhöht (Kirchhefer, Schmitz et al. 1999), was das Leck der Ryanodinrezeptoren steigert (Maier, Zhang et al. 2003) und zur Phosphorylierung spannungsgesteuerter Natriumkanäle führt, die ihrerseits den späten Natriumeinstrom I_{Na} und somit erneut $[\text{Na}^+]_i$ erhöhen (Wagner, Dybkova et al. 2006). Dies begünstigt wiederum eine neuerliche ROS-Emission der

Mitochondrien (Erickson, Joiner et al. 2008, Kohlhaas, Liu et al. 2010). ROS inhibieren außerdem die SERCA (Flesch, Maack et al. 1999) und erhöhen ihrerseits zusätzlich die Öffnungswahrscheinlichkeit der Ryanodinrezeptoren (Xu, Eu et al. 1998). Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass ROS die Integrität der elektromechanischen Kopplung negativ beeinflussen und durch die Aktivierung der CaMKII, die Erhöhung von $[Na^+]_i$ und durch ROS-induzierte neuerliche ROS-Emission einen wichtigen Teil zum Pathomechanismus der Herzinsuffizienz beitragen (Kohlhaas and Maack 2011).

2.1.13 Die Rolle von Eisen und ROS

Maack et al. untersuchten die ROS-Produktion im Myokard von Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie (ICM) sowie dilatativer Kardiomyopathie (DCM). Die Kontrollgruppe bestand aus herzgesunden Patienten (NF) (Maack, Kartes et al. 2003). Hierfür quantifizierten sie als Marker für oxidativen Stress die Aktivität der Aconitase, welche sich umgekehrt proportional zur ROS-Produktion verhält, da die Aconitase durch oxidativen Stress inaktiviert wird (Takemoto, Node et al. 2001). Sie beobachteten einen signifikanten Unterschied der Aconitase-Aktivität, die bei der ICM-Gruppe ($p < 0,05$) und bei der DCM-Gruppe ($p < 0,01$) deutlich geringer ausgeprägt war als bei den Kontrollen (NF) (Maack, Kartes et al. 2003). Dies war der Fall, da durch Superoxidradikale wie $\bullet O_2^-$, H_2O_2 , $ONOO^-$ oder NO das Eisen-Schwefel-Cluster-Gerüstprotein der Aconitase zerlegt wird (Pantopoulos and Hentze 1995, Gardner 1997, Bouton and Drapier 2003, Han, Canali et al. 2005). Man vermutet, dass das auf diese Weise freigesetzte Eisen ebenfalls oxidative Schäden an anderen Zellorganellen verursacht (Lipinski, Starzynski et al. 2005). Bei Dysfunktion der Eisen-Schwefel-Cluster verliert die Aconitase also ebenfalls an Aktivität, was ihre große Eisensensitivität sowie das für ihre Funktion notwendige Vorhandensein der Fe/S-Cluster beweist (Tong and Rouault 2007). Eine verminderte Aconitase-Aktivität führt konsekutiv auch zu einer verringerten Funktion des Citratzyklus. Citrat kann nicht zu Isocitrat umgewandelt werden, akkumuliert und wird stattdessen zur

Bildung von Cholesterol sowie zur Lipidbiosynthese verwendet. Die in einem Modell von Mn-SOD-defizienten Mäusen beobachtete massive Lipidakkumulation in den Lebern der Tiere könnte also auf die superoxidinduzierte Zerstörung der Eisen-Schwefel-Cluster-Gerüstproteine in der mitochondrialen Aconitase zurückzuführen sein (Li, Huang et al. 1995, Armstrong, Whiteman et al. 2004).

2.1.14 Der Phänotyp von Hepatozyten-spezifischen IRP1/2 defizienten Mäuse

Galy et al. untersuchten ein Mausmodell mit hepatozytärer IRP1/IRP2-Defizienz (Galy, Ferring-Appel et al. 2010). Hierbei prüften sie sowohl die Entwicklungen eines spezifischen Knockouts nur eines der beiden Proteine als auch das Fehlen beider gleichzeitig. Während in Abwesenheit von IRP2 die Versuchstiere eine milde mikrozytäre Anämie, eine abnorme körperliche Entwicklung sowie Zeichen einer vermehrten Neurodegeneration aufwiesen (Cooperman, Meyron-Holtz et al. 2005, Galy, Ferring et al. 2005), erschienen die IRP1-defizienten Tiere klinisch unauffällig. IRP1/2 sind zwar für die Regulation des zellulären Eisenhaushaltes obligat, jedoch scheinen beide Proteine den Ausfall des jeweils anderen kompensieren zu können, da die beschriebenen Tiere in beiden Fällen phänotypisch gesund waren (Meyron-Holtz, Ghosh et al. 2004). Waren jedoch sowohl IRP1 als auch IRP2 in den Hepatozyten der Mäuse defizient, waren die Folgen für den Phänotyp der Tiere beträchtlich. Im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe mit normaler Überlebenszeit verstarben alle transgenen Mäuse bereits zwischen dem 8. und 12. Lebenstag nach Geburt. In diesem Zeitraum zeigten sie eine schlechte und abgemagerte Konstitution und waren bis zu 25% leichter als ihre gesunden Geschwistertiere. Weiterhin traten bei den kranken Tieren innere Blutungen in Darm und Gehirn auf. Darüber hinaus entwickelten die transgenen Mäuse eine Fettleber, was sich auch in erhöhtem Lebergewicht sowie erhöhten Triglyceriden niederschlug. Die Mitochondrien zeigten die Ausbildung zahlreicher Vakuolen sowie eine gesteigerte Zellapoptose, was für die starke pathologische Veränderung der Mitochondrien sprach, während

jedoch die anderen Zellorganellen unverändert blieben. Die Mitochondrien waren angeschwollen, mit einer verdichteten Matrix, rarifizierten Cristae der inneren Zellmembran sowie myelinähnlichen Gebilden (Galy, Ferring-Appel et al. 2010). Aufgrund der Tatsache, dass keine der anderen Zellorganellen einen pathologischen Befund aufwiesen, liegt die Vermutung nahe, dass die Mitochondriopathie der Hauptgrund für die Fettleber war, welche die erhöhte Sterblichkeit der transgenen Tiere bedingte (Mantena, King et al. 2008).

Um den genauen Grund für die derartige Veränderung der Mitochondrien zu verifizieren, untersuchten Galy et al. zwei für dieses Zellorganell spezifische Stoffwechselwege: den Citratzyklus (TCA) sowie die Atmungskette (ETC). Im Bezug auf letztere zeigten die Komplexe I, II und III in der Gruppe der transgenen Tiere verglichen mit der Wildtyp-Gruppe eine deutlich verminderte Aktivität, während die der ATP-Synthase nur leicht reduziert war und Komplex IV unverändert blieb. Die Tatsache, dass die Atmungskettenfunktion in den kardiomyozytären Mitochondrien bei beiden Versuchsgruppen nicht beeinträchtigt war, zeigt, dass die Mitochondriopathie ausschließlich die IRP1/IRP2-defizienten Zellen, in diesem Fall also die Hepatozyten, betraf. Auch die Citratzyklus-Enzyme Oxoglutaratdehydrogenase, Citratsynthase, Pyruvatdehydrogenase, Fumarase und Malatdehydrogenase zeigten in der Gruppe der transgenen Tiere eine deutlich erniedrigte Aktivität verglichen mit der Kontrollgruppe. Somit lagen der Mitochondriopathie unter anderem die aus der IRP-Defizienz resultierenden Dysfunktionen von ETC und TCA zugrunde (Galy, Ferring-Appel et al. 2010).

2.1.15 Die Entwicklung und der Phänotyp von Kardiomyozyten-spezifischen IRP1/2 defizienten Mäusen

Es konnte ein Mausmodell generiert werden, bei dem eine Kardiomyozyten-spezifische Defizienz der zentralen zellulären Eisenregulatoren IRP1 sowie IRP2 vorliegt ($ACO1^{flox/flox}$, $IREB2^{flox/flox}$, β -MHC-Cre+ und Kontrollen). Nach einem Myokardinfarkt zeigen diese Tiere einen für das Syndrom der

Herzinsuffizienz charakteristischen Phänotyp, welcher sich im Vergleich zu Kontrolltieren durch eine schlechtere funktionelle aerobe Kapazität (FAC), linksventrikuläre Dilatation, kardiomyozytäre Hypertrophie und gesteigerte Mortalität der Tiere auszeichnet. Zudem entwickelten die IRP1/IRP2-KO-Tiere unter β -adrenerger Stimulation mit Dobutamin *in vivo* ein massiv ausgeprägtes kontraktiles Defizit verglichen mit der Wildtyp-Gruppe (Kempf 2013).

Als einen mechanistischen Ansatz kann der kardiale Eisenmangel der IRP1/IRP2 defizienten Mäuse gesehen werden; im Gesamtherz letzterer sind die Eisenspiegel um bis zu 30% erniedrigt. Weiterhin zeigte sich eine Verminderung der Aktivität von Komplex I der Atmungskette (Kempf 2013). Aus diesen Beobachtungen resultiert die dieser Arbeit zugrundeliegende Annahme, dass die Kardiomyozyten-spezifisch IRP1/IRP2 defizienten Tiere aufgrund des Eisenmangels sowie der daraus konsekutiv erniedrigten Aktivität wichtiger, zum Teil Eisen-abhängiger Enzyme des Citratzyklus einen gestörten Energiehaushalt mit mitochondrialer Dysfunktion und gesteigerter ROS-Produktion entwickeln. Dies ist die Hypothese, die in dieser Arbeit getestet werden soll.

2.1.16 Fragestellung der Arbeit

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war, den Einfluss eines zellulären Eisendefizits auf den Energiehaushalt, die Funktion von Atmungskette und Citratzyklus sowie die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in den Ventrikeln des Herzens zu untersuchen. Hierzu wurden Experimente an isolierten Kardiomyozyten und an isolierten Mitochondrien von Mäusen mit Kardiomyozyten-spezifischer IRP1/2-Defizienz sowie ihren Wildtyp-Geschwistertieren durchgeführt. In Kardiomyozyten wurde ein Messprotokoll durchgeführt, das zur Simulation physiologischen Stresses diente. Hierbei wurden die Zellen erst mit einer niedrigen Frequenz, dann mit einer höheren Frequenz und gleichzeitigem Zufluss des β -adrenergen Agonisten Isoprenalin stimuliert und währenddessen die Effekte auf die Parameter des

Redoxstatus und der elektromechanischen Kopplung beobachtet. Neben der Messung der Zellverkürzungs-Kinetiken und der fluoreszenzoptisch bestimmten NAD(P)H/FAD-Autofluoreszenzmessungen wurde mithilfe des Farbstoffes DCF die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies während des Messprotokolls detektiert.

Die isolierten Mitochondrien beider Versuchsgruppen wurden für unterschiedliche Versuche verwendet. Mithilfe der Atmungsmessung wurde der mitochondriale O_2 -Verbrauch in Anwesenheit unterschiedlicher Substrate detektiert. Die H_2O_2 -Emission der Mitochondrien wurde anhand des Amplex-Ultra-Red Assays gemessen. Die NAD(P)H-Messungen dienten zur Darstellung des NAD(P)H-Pools unter verschiedenen Bedingungen. Mithilfe der elektro-paramagnetischen Resonanzmessung erfolgte die Bestimmung der mitochondrialen Superoxidproduktion. Darüber hinaus erfolgte die photometrische Messung der Citratzyklus-Enzymaktivitäten von Aconitase, Isocitrat-Dehydrogenase, α -Ketoglutarat-Dehydrogenase sowie Malat-Dehydrogenase.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Die Versuchstiere wurden uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Kai Wollert und von Herrn PD Dr. Tibor Kempf von der Medizinischen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt. Es handelt sich hierbei um ein Mausmodell, bei dem eine Kardiomyozyten-spezifische Defizienz der zentralen zellulären Eisenregulatoren IRP1 sowie IRP2 vorliegt ($Aco1^{flox/flox}$, $Ireb2^{flox/flox}$, β -MHC-Cre+ und Kontrollen) (Kempf 2013). Die erste Versuchsgruppe bestand hierbei aus Tieren mit intaktem IRP1/IRP2-System und somit funktionierendem und unverändertem Eisenhaushalt. Diese Wildtyp-Mäuse fungierten als Kontrollgruppe. Die zweite Versuchsgruppe bestand aus den IRP1/IRP2-defizienten Mäusen, deren Eisenkonzentration (nach Messungen der Kollegen der Medizinischen Hochschule Hannover) im Gesamtherz verglichen mit der Wildtyp-Gruppe um etwa 30% erniedrigt war.

Sämtliche Tierversuche fanden unter Genehmigung der Tierschutzkommission der medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes und des Landesamtes für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz Abteilung „Lebensmittel und Veterinärwesen“ nach §8 Abs. 1 Tierschutzgesetzes (TiSchG) des Saarlandes und der Bundesrepublik Deutschland statt. Die Haltung der Tiere erfolgte bei Raumtemperatur von 25-28 °C in Käfigen à 5 Mäusen, wobei die Tiere ihren natürlichen biologischen Tag/Nacht-Rhythmus beibehalten konnten und ihre Nahrung ad libidum erhielten.

3.1.2 Materialien für die Versuchsreihe an Kardiomyozyten

3.1.2.1 Verwendete Substanzen

Substanz	MG	Molarität	Gewicht	Hersteller
Natriumchlorid, NaCl	58,4 g/mol	1130,1 mM	66 g	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat, KH ₂ PO ₄	136,1 g/mol	6,0 mM	0,820 g	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat, Na ₂ HPO ₄	142 g/mol	5,99 mM	0,850 g	
Natriumhydrogencarbonat, NaHCO ₃	84 g/mol	120,2 mM	10,10 g	VWR, Leuven
Kaliumchlorid, KCl	74,6 g/mol	46,9 mM	3,50 g	Sigma- Aldrich
Magnesiumsulfatheptahydrat, MgSO ₄ *7H ₂ O MgSO ₄ -7H ₂ O	246,5 g/mol	12,2 mM	3,00 g	Chemie GmbH, Steinheim
Kaliumhydrogencarbonat, KHCO ₃	101 g/mol	100 mM	10,10 g	
Phenolrot	376,4 g/mol	0,32 mM	0,12 g	
HEPES	238 g/mol	100 mM	2,36 g	

Tabelle 1: Stocklösung.

Substanz	MG	Menge	Hersteller
Stocklösung		25 ml	
2,3-Butandion-Monoxim, BDM	101 g/mol	5 ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
Salzsäure, HCl	36 g/mol	2-3 Tropfen	Steinheim
D-(+)-Glucose, C ₆ H ₁₂ O ₆	180 g/mol	250 mg	
Natriumhydroxid, NaOH	40 g/mol	2-3 Tropfen	
Taurin NH ₂ CH ₂ CH ₂ SO ₃ H	125 g/mol	928 mg	

Tabelle 2: Substanzen zur Herstellung der Myozyten-Isolutionslösung.

Die Myozyten-Isolutionslösung wurde mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 250 ml aufgefüllt. Anschließend wurde mithilfe von Zugabe einiger Tropfen an HCl und NaOH ein pH-Wert von 7,46 eingestellt.

Substanz	Konzentration	Menge	Hersteller
Myozytenisolutionslösung		9 ml	
FCS (Fetales Kälberserum)		1 ml	Invitrogen, Karlsruhe
CaCl ₂	10 mM	12,5 µL	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Tabelle 3: Substanzen zur Herstellung von Stopppuffer 1.

Substanz	Konzentration	Menge	Hersteller
Myozytenisolutionslösung		28,5 ml	
FCS (Fetales Kälberserum)		1,5 ml	Invitrogen, Karlsruhe
CaCl ₂	10 mM	37,5 µL	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Tabelle 4: Substanzen zur Herstellung von Stopppuffer 2.

Substanz	Konzentration	Menge	Hersteller
Myozytenisolationslösung		20 ml	
Trypsin	70 mg/ml	40 µL	Sigma-Aldrich
CaCl ₂	10 mM	25,2 µL	Chemie GmbH, Steinheim
Liberase TH		1,44 mg	Roche Diagnostics, Indianapolis, USA

Tabelle 5: Substanzen zur Herstellung des Liberasepuffers.

Substanz	Konzentration	Hersteller
FCS (Fetales Kälberserum)	5%	Invitrogen, Karlsruhe
HEPES-Pufferlösung	1%	
Medium 199, GlutaMAX	93%	
Penicillin G 10.000 Units/Streptomycinsulfat	1%	

Tabelle 6: Substanzen zur Herstellung des Zellmediums.

Substanz	MG	Konzentration	Hersteller
L-(+)-Ascorbinsäure	176 g/mol	0,053 g/l	Sigma-Aldrich
D-(+)-Glucose, C ₆ H ₁₂ O ₆	180 g/mol	1,802 g/l	Chemie GmbH, Steinheim
Kaliumchlorid, KCl	75 g/mol	0,373 g/l	
Calciumchlorid, CaCl ₂	110 g/mol	1 mM	
Natrium-Hepes, C ₈ H ₁₇ N ₂ O ₄ SNa	260 g/mol	2,603 g/l	
Natriumpyruvat, C ₃ H ₃ NaO ₃	110 g/mol	0,220 g/l	
Magnesiumchlorid, MgCl ₂	95 g/mol	0,203 g/l	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid, NaCl	58 g/mol	7,597 g/l	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Tabelle 7: Substanzen der Tyrodelösung.

Substanz	Konzentration	Hersteller
FCCP, Carbonyl Cyanid 4- 5 μ M (trifluoromethoxy)phenylhydrazon		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Isoprenalin	$3 \cdot 10^{-8}$ M	
H ₂ O ₂	10 mM	Merck, Darmstadt
Natriumcyanid, NaCN	4 mM	FlukaChemie AG, Buchs, Schweiz

Tabelle 8: Weitere Substanzen zur Myozytenmessung im Fluoreszenzmikroskop.

Farbstoff	Hersteller
DCF Pluronic F-127	Invitrogen, Karlsruhe
Lösungsmittel	Hersteller
Dimethylsulfoxid, DMSO, C ₂ H ₆ OS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Tabelle 9: Zur DCF-Messung verwendete Substanzen.

Substanz	Konzentration	Hersteller
Laminin aus Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Maus-Sarkom	0,5 mg/ml	Roche Diagnostics, Indianapolis, USA

Tabelle 10: Zur Beschichtung der Deckgläschen verwendete Substanz.

Substanz	Menge	Hersteller
Heparin-Natrium aus Schweinedarmmukosa, 5000 I.E./ml	0,5 ml = 2500 I.E.	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Isofluran	1,5-2 Vol.-% und 0,5 l O ₂ /min	Baxter, Unterschleißheim
Rimadyl Injektionslösung, 1 ml enthält 50 mg Caprofen und 10 mg Benzylalkohol	0,1 ml = 5 mg Caprofen und 1 mg Benzylalkohol	Pfizer GmbH, Karlsruhe
Softasept Hautdesinfektionsmittel	N	B. Braun Melsungen AG, Melsungen

Tabelle 11: Direkt an den Versuchstieren angewandte Substanzen.

3.1.2.2 Präparations- und Isolationsinstrumentarium

Instrument/Gerät	Hersteller
Aortic Canula 1 mm Durchmesser	Hugo Sachs Elektronik – Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten
Langendorff-Perfusionsanlage	
Feinschere 14088-10	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Lauda Ecoline Staredition Wärmethermostat mit Edelstahlband und Variopumpe	Lauda Dr. R. Wobser, Lauda-Königshofen
Pinzette zum Kanülieren, FD281R	Aesculap, B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Pinzette zur Thorakotomie, 11272-30	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Schere 233-2121	VWR, Darmstadt

Tabelle 12: Präparations- und Isolationsinstrumentarium zur Kanülierung und Perfusion der Herzen.

3.1.2.3 Narkosesystem

Das Narkosesystem zur Betäubung der Versuchstiere setzte sich aus folgenden Einzelkomponenten zusammen:

- Fluovac Gas Evacuation System
- Oxygen Flowmeter (Fluss 0,5 ml/min mit 5% Isofluran)
- Tube Adapter to Fluosorber
- Vaporizer Key Fill Isoflurane
- Gasflasche (5% CO₂ in 95% O₂), Praxair, Düsseldorf
- Gasdruckminderer, GCE Rhöna, Fulda

Sämtliche Einzelteile der Narkoseanlage ohne Herstellerangaben wurden von Hugo Sachs Elektronik-Harvard-Apparatur GmbH, March-Hugstetten, bezogen.

3.1.2.4 Anlage zur Messung von NAD(P)H/FADH₂ und H₂O₂

Die Anlage zur Messung von NAD(P)H/FADH₂ und H₂O₂ bestand aus den folgenden Komponenten:

- Acquisition Computer (inkl. Monitor), Firma Dell
- CFA Option D: Dual Emission option for CFA300
- CFA300 Cell framing adapter
- FSI700 Fluorescence system interface
- MCS100 Myo-Cam-S Digital Variable field rate CCD
- MUS200 µStep stand alone filter wheel and controller
- PMT400 Photomultiplier sub-system
- PTV100 PMT to Voltage Adapter
- Constant Current/Voltage Isolated Stimulators (DS2A/DS3), Warner Instruments
- Mikroskop Nikon Ti-S/L100
- IONWZ IonWizard Core + Analysis (Software)
- SARCACQ SarcLen Messeinheit für Sarkomerlänge (Software)
- Model TC-324B Heater Controller, Single Channel

- Stimulus und Isolation Unit (SIU-102), Warner Instruments
- Filter und Spiegel siehe Tabelle 13.

Abgesehen vom Mikroskop, welches bei Nikon GmbH, Düsseldorf, erworben wurde, wurden alle oben aufgezählten Gerätschaften bei der Firma IonOptix, Dublin, Irland, gekauft. Die Filter und Spiegel wurden von Chroma Technology GmbH, Fürstenfeldbruck, die Lampe Xenon short arc lamp - 75XE (75W) wurde bei Ushio Inc., Tokyo, bezogen.

Spiegel	Bezeichnung	Spiegel (nm)	Transmission (nm)	Farbstoffe	Ort	Typ
T660LPXR	T660LP XR		>660	Durchlicht	Mikroskop	
89017bs F/TR	120298	340/490	435/>505	NAD(P)H/ FAD/ DCF	Mikroskop (Filter 2)	Strahlenteiler
650DCXR		<650	>650	(Durchlicht)	Vor der Kamera	Strahlenteiler
490DCLP	490DCL P	<490	>490	NAD(P)H/ FAD	PMT Spiegel	Strahlenteiler
Reiner Spiegel	Reiner Spiegel	Alles		NAD(P)H/ FAD	PMT Spiegel	Strahlenteiler
D435/35x	D435/35 x	---	435±17,5	NAD(P)H	Vor den PMT's	Filter
D525/30x	D525/30 x	---	525±15	FAD	Vor den PMT's	Filter
D340/12x	D340/12 x	---	340±6	NAD(P)H/ DCF	Filterrad 1	Anregungsfilter hinter der Lampe
S490/20x	S490/20 x	---	490±10	FAD	Filterrad 2	Anregungsfilter hinter der Lampe

Tabelle 13: Übersicht der verwendeten Spiegel.

Tabelle 13 gibt eine Übersicht über die verwendeten Spiegel, deren Transmissionen und Lokalisation im Versuchsaufbau, sowie die Farbstoffe, bei denen der jeweilige Spiegel eingesetzt wurde.

3.1.3 Materialien für die Versuchsreihe an Mitochondrien

Substanz	Konzentration	Hersteller
D-Mannitol	225 mM	Sigma-Aldrich Chemie
HEPES	2 mM	GmbH, Steinheim
EGTA (Ethylinglycol-bis(aminoethylether)-tetraessigsäure)	1 mM	
Sucrose	75 mM	Merck, Darmstadt
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)		VWR International, Darmstadt
Tris HCl (Tris Hydrochlorid)		Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Tabelle 14: Zur Herstellung der Mitochondrien-Isolutionslösung IS verwendete Substanzen.

Die Einstellung des pH-Wertes auf 7,4 erfolgte mithilfe der Zugabe einiger Tropfen TrisBase oder TrisHCl.

Substanz	Konzentration	Hersteller
D-Mannitol	225 mM	Sigma-Aldrich Chemie
HEPES	2 mM	GmbH, Steinheim
Sucrose	75 mM	Merck, Darmstadt
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)		VWR International, Darmstadt
Tris HCl (Tris Hydrochlorid)		Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Tabelle 15: Zur Herstellung der Mitochondrien-Suspensionslösung MSS verwendete Substanzen.

Die Herstellung von MSS erfolgte wie die Herstellung von IS, lediglich ohne Zugabe von EGTA.

Substanz	Konzentration	Hersteller
BSA (Albumin from bovine serum)	4 mg/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Proteinase (bakteriell)	1,6 mg/ml	

Tabelle 16: Zur Herstellung der BSA/Proteinase-Lösung verwendete Substanzen.

Substanz	Konzentration	Hersteller
Rompun (Xylazinhydrochlorid)	2% 23,32 mg/ml	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Ketavet (Ketaminhydrochlorid)	100 mg/ml	

Tabelle 17: Mäusenarkose bei Mitochondrienisolation.

Das Verhältnis von Ketavet zu Rompun betrug 2:1.

Substanz	Konzentration	Hersteller
Kaliumchlorid, KCl	137 mM	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat, KH_2PO_4	2 mM	
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	2,5 mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
HEPES	20 mM	
EGTA (Ethylglycol-bis(aminoethylether)-tetraessigsäure)	0,5 mM	
KOH, Kaliumhydroxid		

Tabelle 18: Atmungspuffer für die Atmungsmessung.

Die Einstellung des pH-Wertes auf 7,2 erfolgte mithilfe der Zugabe einiger Tropfen KOH.

	Substanz	Konzentration (final)	Hersteller
1.	Pyruvat/Malat	500 mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
2.	ADP-Lösung	30 µM	
3.	ADP-Lösung	100 µM	
4.	ADP-Lösung	300 µM	
5.	ADP-Lösung	1 mM	
6.	Oligomycin	1,2 µM	

Tabelle 19: Zugegebene Substrate während der Atmungsmessung.

Substanz	Hersteller
Reagent A	Bio-Rad, Laboratories GmbH, München
Reagent B	
BSA (Albumin from bovine serum)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Tabelle 20: Proteinbestimmung nach Lowry et al.

Substanz	Konzentration	Hersteller
Atmungspuffer	s.o.	
Amplex UltraRed Reagent	50 µM	Invitrogen by Life Technologies GmbH, Darmstadt
Horseradish Peroxidase	0,5 U/ml	
SOD (Superoxide Dismutase from bovine Erythrocytes)	100 U/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Pyruvat/Malat	5 mM	
ADP	30 µM / 100 µM / 300 µM/ 1 mM	
Antimycin A	15 µM	
DNP	5 mM	

Tabelle 21: H₂O₂-Bestimmung mittels Amplex Ultra-Red Assay.

Substanz	Konzentration	Hersteller
Pyruvat/Malat	5 mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
ADP	30 µM / 100 µM / 300 µM / 1 mM	
Antimycin A	15 µM	
DNP	250 µM	FlukaChemie AG, Buchs, Schweiz
Natriumcyanid, NaCN	2,5 mM	

Tabelle 22: Substanzen zur NAD(P)H-Bestimmung.

Substanz	Konzentration	Hersteller
CMH	300 µM	Noxygen
Pyruvat/Malat	25 mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
ADP	5 mM / 10 mM	
Antimycin A	15 µM	
DNP	0,5 mM	

Tabelle 23: Superoxid-Bestimmung mittels elektro-paramagnetischer Resonanzmessung.

Instrument/Gerät	Hersteller
Clark-Elektrode, Oxygen Electron control unit	Hansatech Instruments Ltd., Norfolk, UK
Hamilton Spritze 702 N SYR	Hamilton Messtechnik GmbH, Höchst
MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate	Invitrogen by Life Technologies GmbH, Darmstadt
Micro Amp Optical Adhesive Film	
Kühlzentrifuge, Heraeus Fresco 21	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Microtiter® 96-Well UV Microplates	
Infinite M200Pro Mikroplattenreader	Tecan, Männedorf, Schweiz
ESP 300e Spektrometer mit einem 4102ST Standard-Resonator	Bruker Corporation, Billerica, USA
Photometerküvetten 10x10 mm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Potter S	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Wasserbad HAAKE B3 + HAAKE C10	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Schere 233-2121	VWR, Darmstadt
Uhrmacherpinzette	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg

Tabelle 24: Weitere Materialien für die Versuchsreihe an Mitochondrien.

3.1.4 Sonstige Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Deckgläschen	VWR International, Darmstadt
Discofix C Dreiwegehahn	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Exadrop Tropfenregler mit Infusionsgerät	
Isotone Kochsalzlösung 0,9%	
Original Perfusor Spritze 50 ml	
Wasser, vollentsalzt und destilliert (Aqua dest.)	
Ethicon Mersilene Polyesterfaden 5-0	Johnson-Johnson, Neuss
Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Falcon, Blue Max, 15 ml und 50 ml	Becton Dickinson, N.J., USA
Polypropylene Conial Tube	
Immersionsöl	Cargille Laboratories Inc., Cedar Gove, N.J., USA
MoliNea plus L, Unterlagen	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Nadel BSS Microlane 3	Becton Dickinson, N.J., USA
Spritze 1 ml BD Plastipak	
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
SafeSeal Reagiergefäße, 2 ml	
Sauerstoff	Praxair, Düsseldorf
Zellkulturschalen	TPP , Trasadingen, Schweiz
Durchmesser 100x20 mm	
Zellkulturschalen	
Durchmesser 60x15 mm	
Binokular, SMZ645	Nikon, Düsseldorf
Feinwaage, ABS 120-4	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Gefrierschrank	Liebherr, Bulle, Schweiz
Magnetrührer CAT 6.1	Ingenieurbüro CAT, M. Zipperer GmbH Staufen
pH Elektrode SenTix 22	WTW, Weilheim
pH-Meter, Eutech Instruments, pH 510	VWR, Darmstadt
Zentrifuge Galaxy 16DH	
Vakuumpumpe SP302SA	Schwarzer Precision, Essen
Vortex Mixer, SN 41119030	Labnet International, NJ, USA
Wärmeschrank Heraeus	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0 R	

3.2 Methoden

3.2.1 Methoden für die Versuchsreihe an Kardiomyozyten

3.2.1.1 Mausmyozytenisolation nach AFCS

Zunächst wurde die Perfusionsanlage mit 250 ml Aqua dest. vorgespült. Anschließend wurde der erste Kolben des Gerätes mit Perfusionspuffer luftblasenfrei befüllt. Ebenso wurde mit dem zweiten Kolben verfahren, in den Liberasepuffer eingespült wurde. Nachdem der Maus zunächst Heparin und Schmerzmittel (Tabelle 17) gespritzt worden waren, wurden diese Substanzen für etwa 10 Minuten wirken gelassen. Anschließend wurde die Maus mit Isofluran betäubt. Hierfür wurde die Schnauze des Tieres am Narkosesystem für Kleintiere positioniert. War die Narkose tief genug und die Reflexe erloschen, was man am ausbleibenden Zwischenzehenreflex erkennen konnte, wurden Thorax und Bauch der Maus desinfiziert. Anschließend folgte die Thorakotomie mithilfe einer Schere, indem ein V-förmiger Schnitt vom Bauchnabel in Richtung Axilla gesetzt wurde. Zur Freilegung des Herzens wurden anschließend das Sternum mit einer Pinzette fixiert, das Zwerchfell durchgeschnitten sowie die Brustwirbel medial durchtrennt. Daraufhin wurde das Sternum hochgeklappt und mithilfe einer Feinschere das nun sichtbar gewordene und freiliegende Herz kurz unterhalb des Aortenbogens von sämtlichen zu- und abführenden Gefäßen abgetrennt und entnommen, ehe es über die Aorta kanüliert an die Isolationsanlage gehängt wurde (Abbildung 4, Abbildung 5). Dabei war darauf zu achten, dass die Koronarien frei durchgängig waren und die Aortenklappe nicht penetriert wurde. Es folgte die vollständige Entfernung der noch am Herzen hängenden Gewebe (wie beispielsweise Lunge und Thymus). Nun wurden erst für die Dauer von 4 Minuten die Stocklösung (Tabelle 1) sowie dann für 4 Minuten Liberasepuffer (Tabelle 5) durch das Herz gespült, bis dieses gut verdaut war. Dies war nach 5 min 20 sec der Fall, wenn das Herz aufquoll und klarer erschien. Anschließend wurde es unter den Vorhöfen abgeschnitten und in eine Schale mit Perfusionspuffer überführt. Hier wurde das Herz viermal eingeschnitten und danach in eine neue Schale aufgenommen, welche mit

exakt 5 ml Perfusionspuffer gefüllt war. In diese wurden dann zusätzlich 5 ml Stopppuffer 1 hinzugefügt, woraufhin die Ventrikel in der beladenen Schale 5 Minuten lang vorsichtig geschwenkt wurden. Daraufhin wurde ein Tropfen entnommen, um die Myozyten unter dem Mikroskop anzusehen und zu beurteilen. War die Qualität der Isolation gut, was am backsteinförmigen, stabförmigen Aussehen der Zellen und deren sichtbarer Querstreifung zu erkennen war, wurde die Myozytenlösung in ein 15 ml Röhrchen überführt, wo sich die Zellen nach etwa 8 Minuten am Boden des Gefäßes absetzten. Der so erzeugte Überstand wurde in ein neues 15 ml Röhrchen gefüllt und für eine Minute bei 800 U/min zentrifugiert, während das erste Pellet bereits mit 5 ml Stopp Puffer 2 resuspendiert wurde. Genauso verfuhr man mit dem bei der Zentrifugation entstandenen zweiten Pellet, nachdem man den Überstand verworfen hatte. Beide Pellets wurden nun mit jeweils 5 ml Stopppuffer 2 resuspendiert, anschließend zusammengefügt und zum Calciumaufbau gegeben. Hierbei wurde alle 4 Minuten neue Calciumlösung (Tabelle 25) hinzugegeben und die Schale in Form einer 8 geschwenkt. Die so entstandene Lösung wurde anschließend in ein 15 ml Röhrchen überführt, wo sich nach achtminütiger Sedimentation ein Pellet absetzte. Der Überstand wurde aus dem Röhrchen entnommen und zentrifugiert. Daraufhin wurden beide Pellets zusammengeführt sowie 25 ml des Zellmediums (Tabelle 6), welches zuvor auf 37 °C vorgewärmt worden war, hinzugegeben. Bis die Kardiomyozyten verwendet wurden, wurden diese in ihrem Medium bei 37 °C und 5%-CO₂ Atmosphäre in einem Wärmeschrank aufbewahrt.



Abbildung 4: Langendorff-Perfusionsanlage.



Abbildung 5: In der Anlage hängendes Herz.

3.2.1.2 Lösungen

Schritt	Substanz	Menge
1. Schritt	10 mM CaCl_2 -Lösung	50 μL
2. Schritt	10 mM CaCl_2 -Lösung	50 μL
3. Schritt	10 mM CaCl_2 -Lösung	100 μL
4. Schritt	100 mM CaCl_2 -Lösung	30 μL
5. Schritt	100 mM CaCl_2 -Lösung	50 μL

Tabelle 25: Calciumaufbau.

Die Zugabe der einzelnen Calcium-Lösungen erfolgte schrittweise.

3.2.1.3 Behandlung der Kardiomyozyten für die H_2O_2 -Bestimmung mit dem Farbstoff DCF

Für die DCF-Messungen war es erforderlich, dass beim Ansetzen der Normaltyrode (Tabelle 7) weder Pyruvat noch Ascorbinsäure zugegeben wurden. Dies war obligat, da diese Substanzen als Radikalfänger fungieren sowie über antioxidative Eigenschaften verfügen und in der Folge eine Detektion von H_2O_2 ggf. reduziert hätten. Zur Inkubation der Zellen mit DCF mussten zunächst 86,5 μL des Lösungsmittels DMSO (Tabelle 9) zum DCF-Tube (50 μg) zugegeben werden (finale Stockkonzentration: 1 mM). Sämtliche sich anschließenden Inkubationsschritte mussten bei 37 °C im Brutschrank durchgeführt werden. Zunächst wurde ein 15 ml-Falcon mit Tyrode gefüllt und unter der Bench bereitgestellt. Anschließend wurde 1 ml der Zellen in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß pipettiert, welches daraufhin aufrecht für die Dauer von 5 Minuten in den Brutschrank gestellt wurde. Auf diese Weise setzten sich die Zellen am Boden des Gefäßes ab. Anschließend wurde das überschüssige Medium mithilfe einer Pipette abgenommen. Dabei war darauf zu achten, dass möglichst kein Medium mehr im Eppendorfgefäß zurückblieb, da überschüssiges Medium sich im späteren Verlauf bei den eigentlichen Messungen negativ auf die DCF-Fluoreszenz auswirkte. Nach Zugabe von 1 ml Tyrode sowie 1 μL DCF (finale Endkonzentration: 4 μM) wurde das Eppendorfgefäß leicht geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung des Farbstoffes zu gewährleisten. Zu diesem Zwecke wurde die

Suspension außerdem nun für die Dauer von 20 Minuten horizontal in den Wärmeschrank gelegt. Danach wurde das Eppendorfgefäß für 3-5 Minuten wieder aufgerichtet, damit sich wiederum die Zellen am Boden absetzen konnten. Erneut erfolgte das Abnehmen der überschüssigen Tyrode. Als letzten Arbeitsschritt schloss sich die Zugabe von 1 ml Tyrode an. Anschließend konnten die Zellen ausplattiert werden. Aus 1 ml Zellen konnten etwa 3 Messungen durchgeführt werden.

3.2.1.4 Beschichtung der Deckgläschen

Zur Fixation der Zellen auf dem Deckgläschen wurden letztere mit Laminin beschichtet. Davon wurden mittels einer Pipette 4 µl mittig auf den Objektträger aufgetragen. Ehe man die Myozyten auf das Deckgläschen gab, sollte man ungefähr 20 Minuten warten, damit das aufgetragene Laminin in dieser Zeit trocknen konnte. Um zu gewährleisten, dass die Zellen gut auf dem Objektträger hafteten, sollte nach dem Auftragen der Zellen samt Zellmedium eine Ruhezeit von 5 Minuten eingelegt werden, ehe die Messung beginnen konnte.

3.2.1.5 Bestimmung der Zellverkürzung in Kardiomyozyten

Mit den zuvor präparierten Kardiomyozyten wurde an der Zellverkürzungsanlage der Firma ION Optix ein Messprotokoll durchgeführt, das zur Simulation physiologischen Stresses diente. Für die Durchführung des NADH-Protokolls war vor Beginn der Messung keine weitere Behandlung der Zellen notwendig. Wurde das DCF-Protokoll gemessen, mussten die Zellen zuvor mit dem Farbstoff DCF inkubiert werden (siehe 3.2.1.3). Anschließend konnten die Messungen beginnen. Die Zellen samt Medium wurden auf einen der mit Laminin beschichteten Objektträger aufgetragen, welcher zuvor auf eine Heating-Plattform aufgesetzt worden war. Dann wurde eine mit Silikon abgedichtete Zellkammer über den Objektträger gespannt. Der angeschlossene Stimulator arbeitete selbst kontrollierend und

war auf 100 mA eingestellt. Seinen Stimulationsimpuls erfuhr dieser von einem frequenzvariablen Taktgeber. Zur Übertragung der Stimulation auf das Zellmedium dienten zwei Platinelektroden, die sich an der Zellkammer befanden und mit dem Zellmedium in Kontakt standen. Die Zellkammer auf der Heating-Plattform wurde nun auf das Mikroskop aufgesetzt. Es wurde mit einem 40er-Öl-Immersionsobjektiv gearbeitet. Es folgte nun der Anschluss der Zellkammer einerseits an ein customer-made-Zulaufsystem sowie andererseits an eine Vakuumpumpe, welche zur Absaugung der Flüssigkeit diente. Die über das Zulaufsystem in das Zellmedium geleiteten Lösungen wurden mithilfe eines Durchflusserhitzers auf 37 °C erwärmt. Im Mikroskop befand sich ein Strahlenteiler, welcher im 45°-Winkel eingebaut war. Es existierten zwei verschiedene Lichtquellen. Einerseits traf auf den Objektträger Licht von oben, wobei nur Licht mit einer Wellenlänge von 660 nm den vorgeschalteten Filter durchdringen konnte. Zwischen Lampe und Mikroskop war ein MU-Stepper geschaltet. Dieser bestand aus einem Filterrad mit 6 Filterplätzen, wobei je nach verwendetem Farbstoff ein anderer Filter benutzt wurde (Tabelle 13). Der jeweilige Filter war dazu in der Lage, eine dem verwendeten Farbstoff entsprechende Wellenlänge passieren zu lassen. Das aus der Xenonlampe einfallende Licht wurde nun im 45°-Winkel vom Strahlenteiler nach oben reflektiert und traf auf die Zellkammer. Die dabei entstehenden Fluoreszenzen der Farbstoffe beziehungsweise die Autofluoreszenzen passierten den Strahlenteiler und trafen auf den Photomultiplier auf, nachdem sie zuvor durch in Cubes befindlichen Filtern je nach Wellenlänge verteilt wurden. Die Cubes wurden von Hand gewechselt. Der Photomultiplier detektierte die einfallenden Photonen und wandelte diese in Spannungssignale um. Diese Signale wurden nun in das Fluoreszenzsystem Interface eingespeist. Interface diente als Schnittstelle zwischen Photomultiplier, Taktgeber und Computer. Über das Programm ION-WIZARD 6.4 Revision 1 von ION Optix LLC erfolgten die Aufzeichnung und Analyse der gemessenen Daten. Weiterhin wurden vom Computer die Live-Aufzeichnungen der Myo-Cam angezeigt. Dabei handelte es sich um eine Schwarz-Weiß-Kamera, welche die Zelle filmte. Hierbei wurde das Bild nicht gespeichert, sondern diente lediglich zur Berechnung

der Sarkomerlängenverkürzung, welche über die von der Software gescannte Schwarz-Weiß-Musterung der Zelle erfolgte.

Nach diesen Vorbereitungen konnte mit den Messungen begonnen werden. Dafür musste zunächst eine Zelle im Sichtfeld positioniert und scharfgestellt werden. Dann wurde zunächst für eine Zeit von 120 s Normaltyrode eingespült und die Zelle mit 0,5 Hz stimuliert. Dieses sogenannte „Einschlagen“ diente zur Gewöhnung der Zelle an die Versuchsbedingungen. Anschließend wurde so lange Isoprenalin über das Zulaufsystem zugeführt, bis eine deutliche Steigerung der Kontraktilität beobachtet werden konnte. Dies war in der Regel nach ca. 60 s der Fall. Dann wurde unter anhaltendem Zufluss von Isoprenalin die Frequenz im Taktgeber für die Dauer von 180 s auf 5 Hz hochgeschaltet. Im Anschluss daran wurde sowohl die Frequenz wieder auf 0,5 Hz zurückgeschaltet sowie die Flüssigkeitszufuhr von Isoprenalin wieder auf NT umgestellt. Dieser Zustand wurde für ungefähr 60 s so belassen, sodass sich die Zelle wieder von dem ausgesetzten Stress erholen konnte. Die sich nun anschließenden Schritte zur Kalibrierung variierten je nach Messprotokoll (Abbildung 6 bis Abbildung 9).

3.2.1.6 Aufbau der IonOptix Anlage

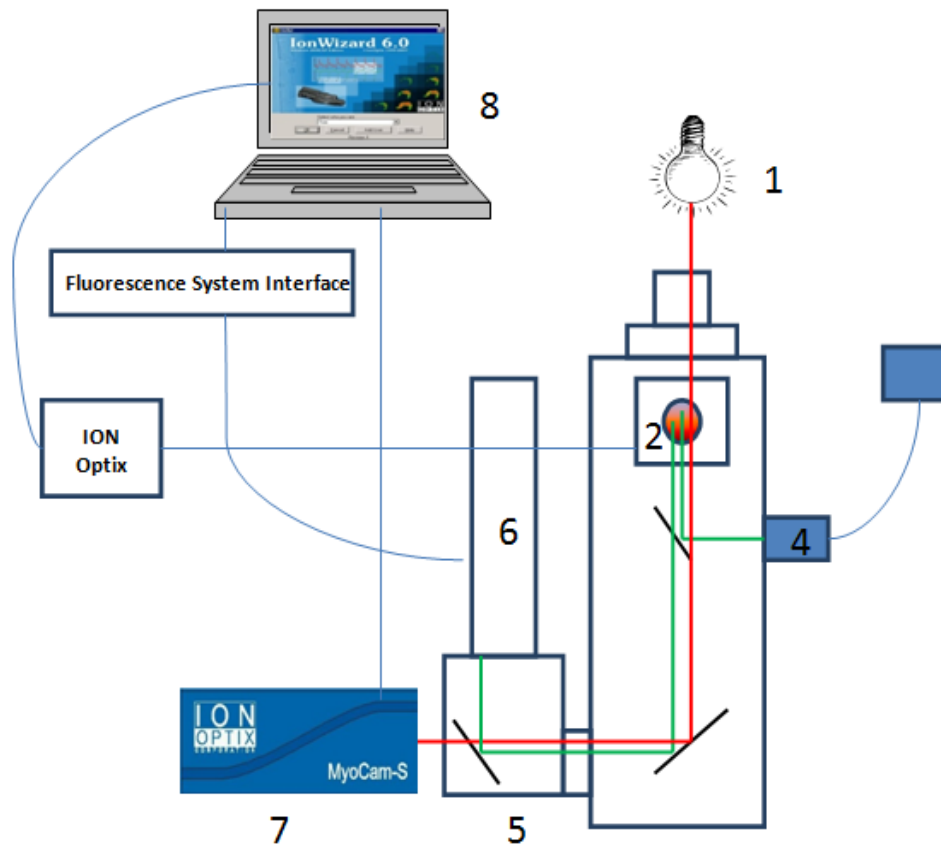


Abbildung 6: Schematische Darstellung der IonOptix-Anlage zur Fluoreszenz- und Sarkomerlängenmessung.

- 1) Lampe zur Darstellung der Myozyten und der Sarkomerlängenmessung. Rote Linie = Durchlicht.
- 2) Heating Plattform mit Zellkammer auf Mikroskoptisch.
- 3) Xenon Arc Lamp, grüne Linie = Anregungslicht + Emissionslicht der Farbstoffe
- 4) μ Step mit Filterrad
- 5) Zell-Frame-Adapter inklusive Cubes
- 6) Photomultiplier 1-3
- 7) MyoCam
- 8) Computer mit Programm IonWizard und IonOptix

3.2.1.7 Einstellung des Photomultiplier

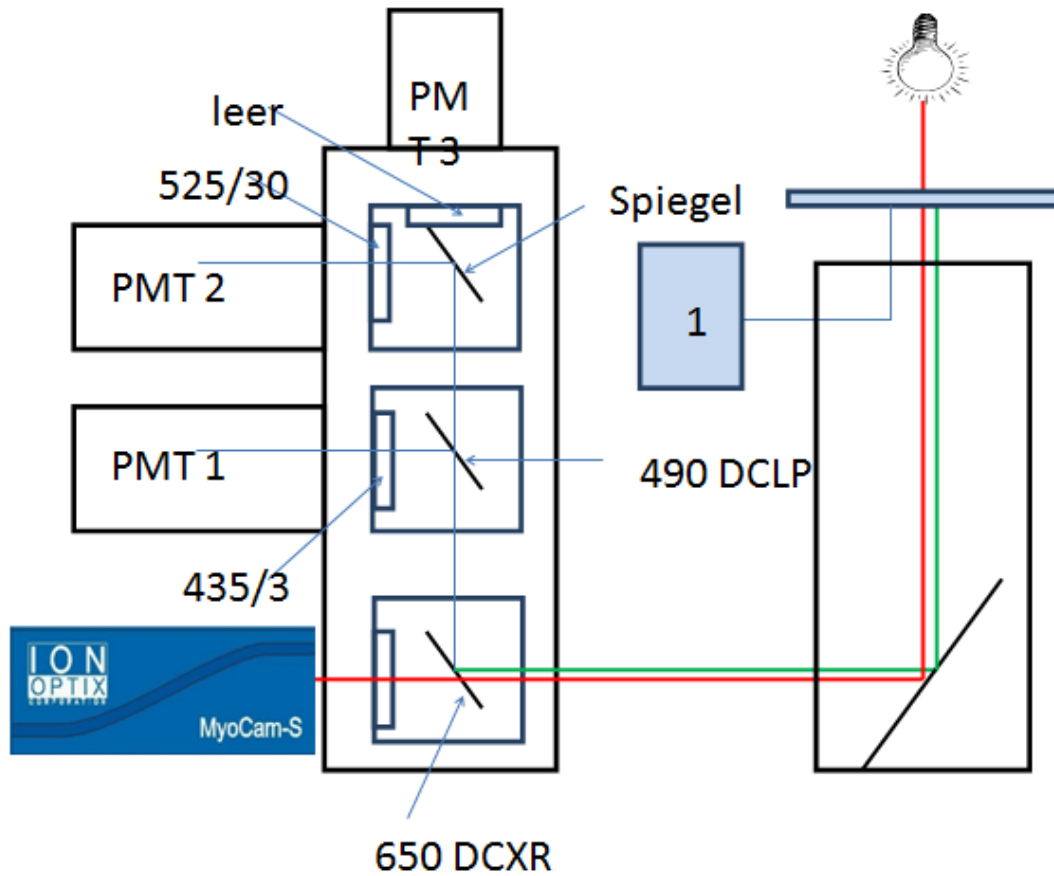


Abbildung 7: PMT-Einstellung zur Messung der Fluoreszenzen von NAD(P)H/FAD bzw. DCF.

- 1) Xenon Arc Lamp inklusive Filterrad; grüne Linie = Anregungslicht + Emissionslicht der Farbstoffe; rote Linie = Durchlicht. Die Zahlen neben der Anlage beziehen sich auf die verwendeten Filter (Tabelle 1).

3.2.1.8 Zulaufanlage

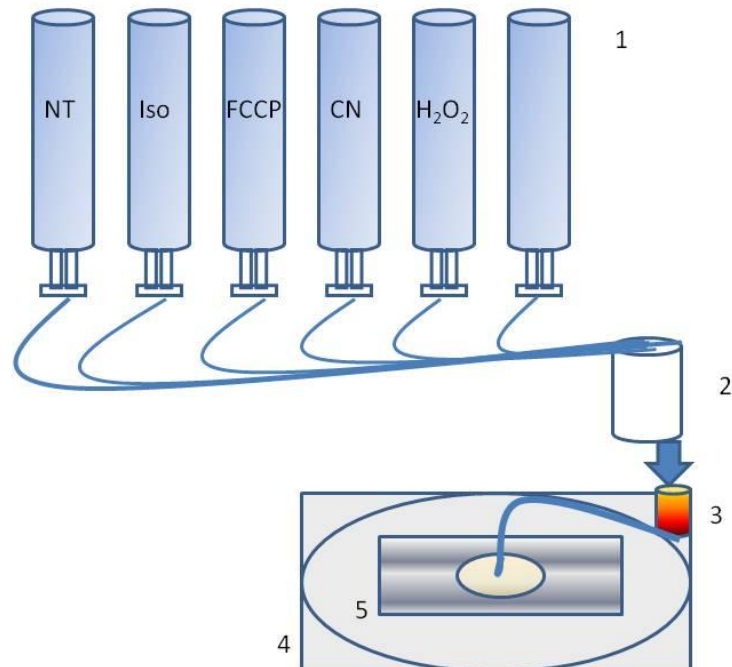


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Messkammer mit den Myozyten auf dem Mikroskop.

- 1) Zuführende Gefäße
- 2) Mischkammer
- 3) Heizung
- 4) Messkammer
- 5) Deckgläschen mit Myozyten

3.2.1.9 Übersicht über das Messprotokoll der zellulären Fluoreszenzen von NAD(P)H/FAD bzw. von NADH/DCF

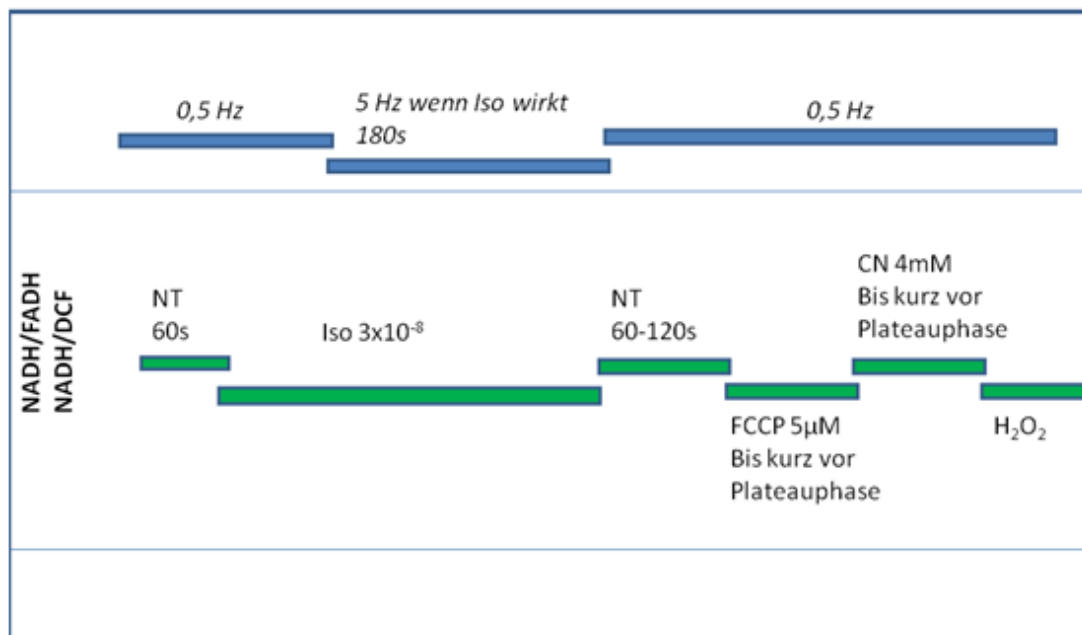


Abbildung 9: Übersicht über das Messprotokoll der zellulären Fluoreszenzen von NAD(P)H/FAD bzw. von NAD(P)H/DCF.

3.2.1.10 Fluoreszenzfarbstoffe

In den Experimenten wurden einerseits die Autofluoreszenzen von NADH, NADPH und FAD sowie andererseits die mitochondriale H₂O₂-Produktion mit dem Fluoreszenzfarbstoff DCF gemessen.

3.2.1.11 NAD(P)H/FAD- Autofluoreszenzmessungen

NADH fungiert als primäre Elektronenquelle der Atmungskette. Es gibt an Komplex I seine Elektronen ab. Anhand der Autofluoreszenz von NADH konnten im Verlauf des Messprotokolles die relativen Veränderungen im Elektronenhaushalt sowie die regulatorischen metabolischen Veränderungen der Kardiomyozyten untersucht werden. Auf diese Weise konnte man schnell die Vorgänge im mitochondrialen myokardialen NADH-System abbilden, ohne in letzteres einzugreifen. Bei einer Wellenlänge von etwa $\lambda = 340 \text{ nm}$

absorbiert NADH ultraviolettes Licht; bei etwa $\lambda = 450 \text{ nm}$ erfolgt die Emission einer blauen Fluoreszenz. Im Gegensatz dazu sind bei NAD^+ , also der oxidierten Form des NADH, sowohl Absorption als auch Fluoreszenz bei den letztgenannten Wellenlängen deutlich geringer. Aufgrund der Tatsache, dass im Herzen das blau emittierte Licht größtenteils von gebundenem NADH sowie reduziertem NADPH (fortan als NAD(P)H bezeichnet) der Mitochondrien stammt und nur in geringen Teilen vom frei im Zytosol befindlichen NADPH ausgeht, wurden in den Versuchen hauptsächlich die Mitochondrien abgebildet. Weiterhin erfolgte die Detektion der Autofluoreszenz von FAD, welche bei $\lambda = 485 \text{ nm}$ angeregt wurde, und somit im Umkehrschluss auch die von FADH_2 , das als Elektronendonator an Komplex II der Atmungskette fungiert und welches bei dieser Wellenlänge eine zu vernachlässigende Autofluoreszenz aufweist. Da NADH und FADH_2 wichtige Coenzyme vieler Enzyme der Atmungskette darstellen, kann man durch die Relation der jeweiligen Fluoreszenzintensitäten von NAD(P)H und FAD Aufschluss über den Redoxstatus der Zelle erlangen. So stellt sich dieser sehr sensitive Parameter beispielsweise im Falle einer erhöhten metabolischen Aktivität auf zellulärer Ebene als Oxidation des Redoxstatus, also als erhöhter Verbrauch der Redoxäquivalente dar. Zur Kalibrierung wurden stabile Werte in Gestalt von Plateaus sowohl von NAD(P)H als auch von FAD bei ihrem Minimal- sowie Maximalwert benötigt. Diese generierte man einerseits durch die vollständige Oxidation mithilfe der Zugabe des Atmungsketten-Entkopplers FCCP (0% NAD(P)H , 100% FAD) und andererseits durch die vollständige Reduktion unter Zugabe von Cyanid, eines Hemmstoffes von Komplex IV der Atmungskette (100% NAD(P)H , 0% FAD).

3.2.1.12 H_2O_2 -Bestimmung mittels DCF

Dichlorodihydrofluoreszindiazetat (H_2DCFDA) wurde dazu benutzt, die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zu detektieren. Unter Abspaltung von Acetatgruppen durch intrazelluläre Esterasen sowie anschließender Oxidation durch ROS wird das zellgängige und nichtfluoreszierende

Dichlorodihydrofluoreszindiazetat in das nicht mehr zellpermeable sowie hochgradig fluoreszierende Dichlorofluoreszin (DCF) umgewandelt. In den Messungen wurde vornehmlich H_2O_2 detektiert, wobei H_2DCFDA auch in Anwesenheit von $\cdot\text{O}_2^-$ oder ONOO^- zu DCF oxidiert werden kann. H_2O_2 entsteht im Mitochondrium mithilfe der Mangan-Superoxiddismutase (Mn-SOD). Letztere wandelt die Superoxidanionen, welche bereits unter physiologischen Bedingungen an Komplex I und II der Atmungskette entstehen, in H_2O_2 um (Kohlhaas and Maack 2013). Wurde einmal DCF gebildet, fungiert dieses als eine Art Photosensibilisator für H_2DCFDA ; es überträgt das abgestrahlte Licht auf H_2DCFDA , was zur neuerlichen Bildung von DCF führt. Am Ende jeder Messung wurde durch Zugabe von H_2O_2 eine Positivkontrolle für den Farbstoffgehalt auf den Kardiomyozyten durchgeführt, woraufhin bei suffizienter DCF-Beladung der Zellen ein enormer Anstieg des Signals zu verzeichnen war (Life Technologies).

3.2.1.13 Auswertung der Messergebnisse

Zur graphischen Darstellung sowie zur statistischen Auswertung wurden Windows Excel sowie das Graphikprogramm GraphPad Prism (der Firma GraphPad Software Inc.) verwendet. Zunächst erfolgte die Übertragung der Messdaten aus dem Programm IonWizard in Windows Excel. Hierbei wurden im Falle der Fluoreszenzmessungen alle Messwerte miteinbezogen. Bei den Experimenten zur Zellverkürzung bediente man sich lediglich der Daten von folgenden 4 Messzeitpunkten:

- I: nach etwa 60 s bei einer Frequenz von 0,5 Hz
- II: unmittelbar vor der Frequenzerhöhung auf 5 Hz
- III: etwa 160 s nach der Frequenzerhöhung auf 5 Hz
- IV: etwa 30 s nach der Frequenzsenkung zurück auf 0,5 Hz

Zu jedem Zeitpunkt wertete man 3-4 Verkürzungsamplituden aus, um dann aus diesen den Mittelwert zu bilden und anschließend zwischen Wildtypen und transgenen Mäusen zu vergleichen. Es wurden einerseits die systolische

und die diastolische Zelllänge sowie das Fractional Shortening, sowie andererseits die kinetischen Parameter Time-to-peak-Gradient und die Relaxationszeit gemessen. Anhand einer two-way ANOVA-Analyse mit Bonferroni posttest bzw. einem ungepaarten t-Test erfolgte die statistische Auswertung. Unterschiede wurden dann als statistisch signifikant angesehen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit bei $p < 0,05$ lag. Dargestellt wurden die Ergebnisse als arithmetischer Mittelwert mit dazugehörigem Standardfehler des Mittelwertes.

3.2.2 Methoden für die Versuchsreihe an Mitochondrien

3.2.2.1 Mitochondrienisolation

Zur Mitochondrienisolation mussten alle benötigten Materialien auf Eis liegen. Die Zentrifuge musste auf 4 °C vorgekühlt sein. Zunächst wurde die Maus mit Rompun/Ketavet betäubt (Tabelle 17). Anschließend wurde das Herz entnommen, wobei diese Prozedur der Mausmyozytenisolation ähnelte (siehe 3.2.1.1). Das Herz wurde nun in eine mit Isolationspuffer gefüllte Zellkulturschale gelegt und freipräpariert. Nun wurden die Ventrikel vom restlichen Herz separiert, anschließend geöffnet und dann geschwenkt, um das übrige Blut zu entfernen. Die so gesäuberten Ventrikel wurden dann in ein mit BSA/Proteinase-Lösung gefülltes Reaktionsgefäß gelegt und klein geschnitten. Das Gemisch wurde in ein Pottergefäß überführt und für 7 Minuten homogenisiert, ehe erneut 500 ml BSA/Proteinase-Lösung hinzugegeben wurde. Dann folgte eine weitere Homogenisierung für die Dauer von 7 Minuten. Die so entstandene Suspension wurde anschließend wieder in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Es schlossen sich die folgenden Zentrifugationsschritte an:

- Die Suspension für 5 Minuten bei 400 g zentrifugieren
- Das Pellet verwerfen, den Überstand (welcher die Mitochondrien enthält) in ein neues Reaktionsgefäß überführen
- Den Überstand für 10 Minuten bei 7700 g zentrifugieren

- Den neu entstandenen Überstand (der nun dem Zytosol entspricht) in ein frisches Reaktionsgefäß überführen und auf Eis lagern
- Das Pellet (das den Mitochondrien entspricht) in 400 µL MSS resuspendieren und dann mit 1 ml MSS auffüllen
- 5 Minuten bei 7700 g zentrifugieren
- Überstand verwerfen und das neu entstandene Pellet erneut in 400 µL MSS resuspendieren und anschließend mit 1 ml MSS auffüllen
- 5 Minuten bei 7700 g zentrifugieren
- Überstand verwerfen und das neu entstandene Pellet mit 100 µL MSS resuspendieren

Die auf diese Weise isolierten Mitochondrien standen nach der Proteinbestimmung (siehe 3.2.2.2) zur weiteren Verwendung bereit.

3.2.2.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung erfolgte modifiziert nach der Methode von Lowry mithilfe des BioRad Kits XX. Hierbei wurden zunächst 2 µl des Mitochondrienlysats mit 18 µl Ampuwa verdünnt. Anschließend erfolgte einerseits die Zugabe von 100 µl Reagent A unter Bildung eines blau-violetten Biuret-Komplexes sowie andererseits die Zugabe von 800 µl Reagent B, woraufhin Molybdänblau entstand (Tabelle 20). Nachdem die Lösung gründlich gevortext worden war, erfolgte eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Daraufhin wurde die Extinktion der Lösung bei 750 nm gegen einen Leerwert detektiert. Die Ermittlung der Proteinkonzentration erfolgte mittels einer Standardkurve, welche aus steigenden definierten Konzentrationen BSA (Bovines Serum Albumin) bestimmt worden war. Es fand eine Dreifachbestimmung jeder Probe statt, wobei letztendlich der Mittelwert als Proteinkonzentration verwendet wurde (Lowry, Rosebrough et al. 1951).

3.2.2.3 Atmungsmessung

Die Messungen dienten dazu, die Qualität mitochondrialer Atmung durch deren Sauerstoffverbrauch zu bestimmen. Die Experimente wurden an der Clark-Elektrode durchgeführt, welche mit dem Computer verbunden war. Die Daten wurden über das Messprogramm „Oxygraph Plus“ erfasst. Zu den Vorbereitungen für die Messungen gehörten das Erhitzen des Wasserbades auf 37 °C sowie die Kalibrierung der Elektrode mit Atmungspuffer. Dazu wurde unter Zugabe von Atmungspuffer der Anfangswert in Abhängigkeit der Temperatur von 37 °C sowie des Umgebungsdruckes von 1 hPa detektiert. Weiterhin wurde der 0%-Wert ermittelt, indem Natrium-Ditionit hinzugegeben wurde, wodurch der gesamte Sauerstoff der Lösung gebunden wurde.

Vor jedem Experiment sollte die Messkammer mindestens zwei Mal mit bidestilliertem H₂O gespült werden. Jede Messung umfasste ein Volumen von 2 ml, wobei diese Menge sich aus Mitochondrien sowie dem Atmungspuffer zusammensetzte. Bei jeder Messung wurden 400 µg Protein eingesetzt. Nun konnte mit der eigentlichen Messung begonnen werden. Zunächst wurde Atmungspuffer vorgelegt, der Magnetrührer wurde eingeschaltet und die Messung gestartet. Sobald das Signal der Messung stabil war, konnten die Mitochondrien zum Atmungspuffer hinzugegeben werden. Anschließend wurde der Deckel so verschlossen, dass die Lösung in dessen schmalen Teil aufstieg. Nun wurde erneut 2-3 Minuten gewartet, bis das Signal sich stabilisiert hatte. Dies war der sogenannte „state 1“. Dann konnten durch Verwendung einer Hamiltonspritze verschiedene Substrate hinzugegeben werden, wobei darauf zu achten war, dass immer erst dann ein neues Substrat verwendet werden konnte, wenn sich das Signal wieder eingependelt hatte. Jede Zugabe eines neuen Substrates während der Atmungsmessung wurde hierbei im Versuchsverlauf vermerkt. Nach etwa einer Minute in state 1 wurden 20 µl Pyruvat/Malat (Endkonzentration in der Kammer: 5 mM) hinzugegeben, woraufhin wieder 2-3 Minuten Wartezeit folgten, um die state-2-Atmung zu etablieren. Anschließend wurden 10 µl ADP verschiedener Konzentrationen (Tabelle 19) hinzugefügt, wobei auch hier mit der Zugabe des nächst höher konzentrierten ADP-Substrates wieder

so lange gewartet wurde, bis sich (je nach Konzentration) eine stabile state-3- bzw. state-4-Atmung etabliert hatte, was nach 2,5 Minuten der Fall war. Nach der letzten ADP-Zugabe erfolgte die Zugabe von 10 µl Oligomycin (Endkonzentration in der Kammer: 1,2 µM), welches als Inhibitor der ATP-Synthase fungiert und somit den O₂-Verbrauch der Mitochondrien senkt, was den state 4 darstellte. Dieser wurde erneut über einige Minuten beobachtet, bis sich ein stabiler Wert eingestellt hatte. Wenn alle Experimente abgeschlossen waren, wurde die Kammer zur Lagerung wieder mit KCl-Lösung gefüllt.

3.2.2.4 NAD(P)H-Messung

Die Messungen dienten dazu, mithilfe eines Fluoreszenz-Platten-Readers den mitochondrialen NAD(P)H-Pool zu detektieren. Hierzu wurden die Veränderungen des NADPH-Gehalts unter Zugabe verschiedener ADP-Konzentrationen beobachtet. Die Versuche fanden bei 37 °C in Atmungspuffer statt. Die Gesamtdauer der Messung betrug 21 Minuten. Pro Minute wurde jeweils eine Doppelbestimmung der Fluoreszenzintensität von NAD(P)H mit nachfolgender Berechnung des Mittelwertes durchgeführt. Aufgrund der Tatsache, dass 4 verschiedene ADP-Konzentrationen gemessen wurden, wurden pro ADP-Bedingung 2 Wells verwendet (jeweils eines für die Wildtyp- und eines für die transgenen Mitochondrien); insgesamt also 8 Wells. Zunächst erfolgte die Bestimmung des basalen NAD(P)H-Pools, indem sich pro Well zusätzlich zum Atmungspuffer lediglich 80 µg Mitochondrien befanden. Nach 4 Minuten wurden 10 µl Pyruvat/Malat hinzugegeben. Anschließend erfolgte nach weiteren 6 Minuten die Zugabe von 10 µl der jeweiligen ADP-Konzentration (Tabelle 22). Zur Kalibrierung wurden nach dreiminütiger Messung der ADP-Bedingungen 10 µl Cyanid hinzugegeben, um den Maximalwert zu detektieren. Nach weiteren 3 Minuten wurde der Atmungskettenentkoppler Dinitrophenol hinzugefügt, wodurch der Minimalwert bestimmt wurde. Die Angabe der Messergebnisse erfolgte als prozentualer Wert vom Maximalwert, wobei die basale Fluoreszenz als Background vom Maximalwert abgezogen wurde.

3.2.2.5 Messung von extramitochondrialem H_2O_2 mittels Amplex Ultra-Red-Assay

Der Amplex Ultra-Red-Assay diente dazu, die H_2O_2 -Emission der Mitochondrien zu detektieren. Hierzu wurde der H_2O_2 -sensitive und spezifisch fluoreszierende Farbstoff Amplex®UltraRed (AUR) verwendet. AUR reagierte mit H_2O_2 unter Bildung des fluoreszierenden Endproduktes Resorufin (Extinktion bei 535 nm, Emission bei 590 nm) in einem Verhältnis von 1:1, wobei diese Reaktion von der Horseradish Peroxidase (HRP) katalysiert wurde. Durch die Extinktionsmessung des entstehenden Resorufins konnten Rückschlüsse auf die Bildung von H_2O_2 gezogen werden. Die Messungen selbst erfolgten entweder an den Mitochondrien alleine oder aber nach Zugabe von Pyruvat/Malat, ADP, DNP (Dinitrophenol) als einem Entkoppler der Atmungskette, oder Antimycin A. Zur Versuchsdurchführung wurden 96-well-Platten benutzt, wobei pro well 30 μ g Mitochondrien verwendet wurden. Die Experimente wurden bei 37 °C in Atmungspuffer durchgeführt. Die gesamte Messdauer betrug 2 Stunden, wobei in 2-Minuten-Intervallen gemessen wurde. Die Messungen wurden am Fluoreszenz-Platten-Reader durchgeführt. Die Daten wurden über das Programm Tecan GENios Pro Reader aufgezeichnet.

	Mitochondrien	P/M	ADP [30 μ M]	ADP [100 μ M]	ADP [300 μ M]	ADP [1 mM]	DNP	Antimycin A
Atmungspuffer	20	20	10	10	10	10	0	0
Mitochondrien	10	10	10	10	10	10	10	10
AUR	170	170	170	170	170	170	170	170
ADP	0	0	10	10	10	10	0	0
DNP	0	0	0	0	0	0	10	0
Antimycin A	0	0	0	0	0	0	0	10

Tabelle 26: Pipettierschema für die Messungen mit Amplex Ultra-Red.

3.2.2.6 Elektro-Paramagnetische Resonanzmessung

Die elektro-paramagnetische Resonanzmessung diente der Detektion von Superoxidradikalen. Hierbei wurde bei jeder Messung dem jeweiligen Gemisch der Radikalfänger CMH (1-Hydroxy-3-Methoxycarbonyl-2, 2, 5, 5-Tetramethylpyrrolidin) zugefügt, sodass man über die Quantifizierung der entstandenen CM-Radikale Rückschlüsse auf die Superoxidproduktion ziehen konnte. Die Versuchsdurchführung erfolgte mithilfe eines Spektrometers. Die Mitochondrien wurden zunächst für die Dauer von 3 Minuten bei 37 °C mit Pyruvat/Malat vorinkubiert. Anschließend wurde die Lösung je nach zu messender Bedingung mit verschiedenen Substanzen versetzt (Tabelle 27), wobei bei jeder Messung die finale Zugabe von CMH die Reaktion startete. Das Gemisch wurde zu Beginn in eine Glaskapillare übertragen und diese mit Silikonpaste verschlossen. Nun wurde das Röhrchen in den Kapillarhalter eingespannt, welcher Bestandteil des Spektrometers und zuvor auf 37 °C eingestellt worden war. Daraufhin wurde das Messprotokoll gestartet und im Zuge dessen die sich in einem Magnetfeld (0,1 mT) befindliche Probe für die Dauer von 8 Minuten im Mikrowellenfeld der Stärke 20 mW bestrahlt. Die zu messenden Werte wurden über das Programm LilaX aufgezeichnet und später über das Programm Medeia ausgewertet. Es wurden dabei sowohl der Verlauf der Superoxidradikalproduktion als auch die tatsächliche Menge an entstandenen Radikalen betrachtet. Letzteres war möglich, da zu Beginn eines jeden Messtages 100 µM Tempol als Referenz gemessen wurde.

Bedingung	Pyruvat/Malat	Mitochondrien	CMH	Weitere Substanzen
Pyruvat/Malat	10 µl	20 µl	10 µl	10 µl Atmungspuffer
ADP (100 µM)	10 µl	20 µl	10 µl	10 µl ADP
ADP (1 mM)	10 µl	20 µl	10 µl	10 µl ADP
ADP/FCCP	10 µl	20 µl	10 µl	10 µl ADP/FCCP
ADP/Antimycin A	10 µl	20 µl	10 µl	10 µl ADP / Anti A

Tabelle 27: Pipettierschema für die elektro-paramagnetische Resonanzmessung.

4 Ergebnisse

4.1 Versuchsreihe an Kardiomyozyten

4.1.1 Zellverkürzungsmessungen

Anhand der oben beschriebenen Protokolle wurde untersucht, inwiefern der IRP1/IRP2-KO einen Einfluss auf die elektromechanische Kopplung bei normaler sowie bei erhöhter Arbeitslast ausübt. Im Vergleich dazu wurden die Kardiomyozyten der Wildtyp-Mäuse unter gleichen Bedingungen untersucht.

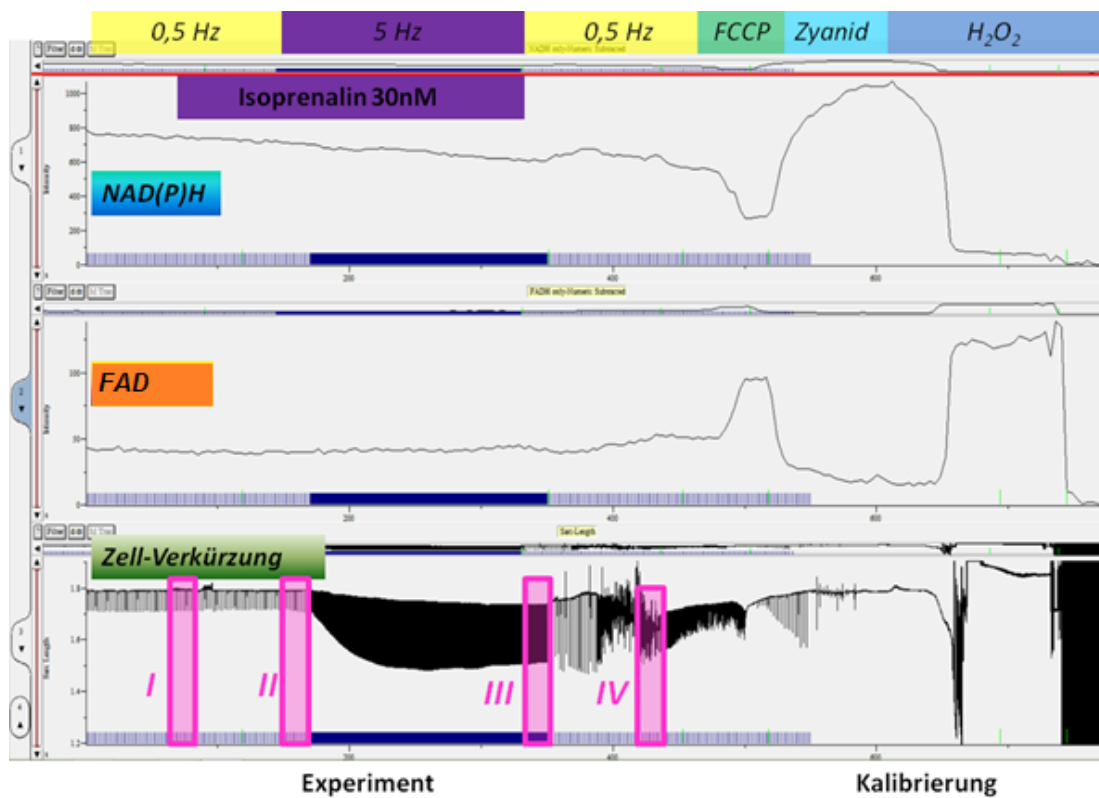


Abbildung 9: Exemplarisches Messfenster-Protokoll während Detektion von NAD(P)H/FAD mit Zellverkürzung mit IonWizard.

Zeitmesspunkte I-IV; I: 60 s nach Versuchsbeginn (Frequenz bei 0,5 Hz); II: Zunahme der Verkürzungsamplitude nach Einspülen des β -adrenergen Agonisten Isoprenalin (Frequenz bei 0,5 Hz); III: 160 s nach Erhöhung der Stimulationsfrequenz bei fortbestehender β -adrenerger Stimulation durch Isoprenalin (Frequenz 5 Hz); IV: 60 s nach Senkung der Stimulationsfrequenz und Auswaschen (wash-out, WO) von Isoprenalin aus der Zelle durch Einspülen von Normaltyrode (Frequenz 0,5 Hz).

Um Aussagen über die Zellverkürzung treffen zu können, wurden verschiedene Parameter, welche jeweils auf die Baseline (also die basale Zelllänge) bezogen wurden, untersucht sowie zwischen der IRP1/IRP2-KO- und der Wildtyp-Gruppe verglichen. Die wichtigsten Parameter diesbezüglich sind die gesamte Sarkomerlänge sowie die fraktionelle Sarkomerverkürzung bezogen auf die Baseline zu den 4 Messzeitpunkten. Zunächst war die Sarkomerlänge selbst in beiden Gruppen zu den 4 Messzeitpunkten nicht signifikant verschieden (Abbildung 10). Ebenso verhielt es sich mit der fraktionellen Zellverkürzung bezogen auf den Basalwert (Abbildung 11). Letztere stieg zunächst bei beiden Gruppen unter der β -adrenergen Stimulation durch Zugabe von Isoprenalin bei 0,5 Hz leicht an und war schließlich unter 5 Hz am stärksten ausgeprägt, nahm jedoch sowohl bei Wildtyp- als auch bei IRP1/IRP2-KO-Myozyten in gleichem Maße zu. Unter der Wirkung von Isoprenalin war die Zellverkürzung in beiden Gruppen also gleich stark ausgeprägt. Dies geht auch aus dem Kurvenverlauf bezogen auf die Sarkomerlänge hervor, die bei beiden Gruppen zunächst unter Isoprenalin bei 0,5 Hz einen leichten und unter Isoprenalin bei 5 Hz den größten Abfall der absoluten Sarkomerlänge anzeigt. Während des Auswaschens von Isoprenalin bei 0,5 Hz stieg die Sarkomerlänge bei beiden Versuchsgruppen wieder leicht an, während die fraktionelle Zellverkürzung nach der Stimulation mit Isoprenalin bei 5 Hz beim Auswaschen nahezu gleich blieb. Insgesamt konnten bei allen beobachteten Parametern keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp- und transgenen Mäusen festgestellt werden, woraus wir schlussfolgerten, dass die Kardiomyozyten letzterer kein kontraktiles Defizit aufwiesen und anhand dieser Werte ein vergleichbares Ausmaß an (durch die elektromechanische Kopplung verursachte) Arbeit verrichteten (Abbildung 10, Abbildung 11).

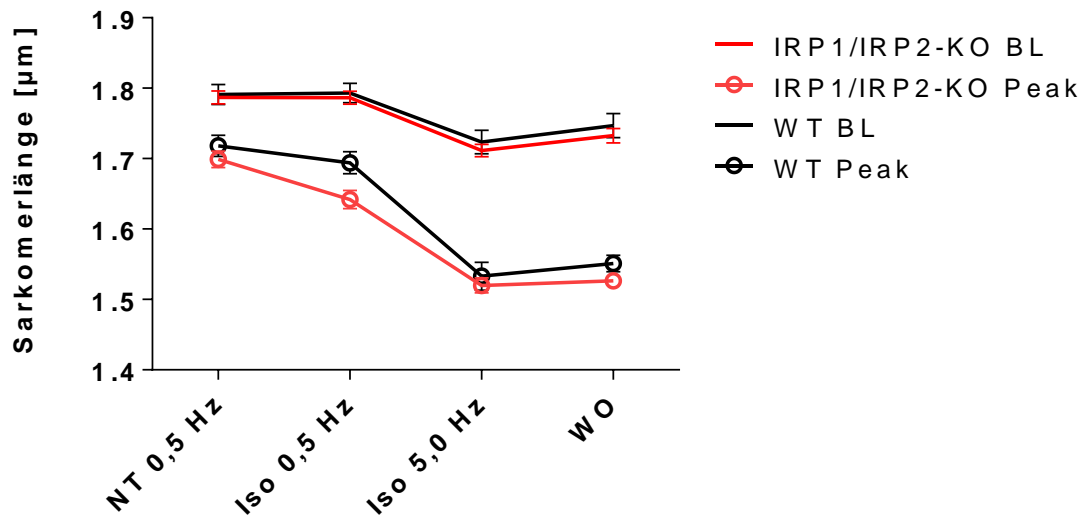


Abbildung 10: Sarkomerlängen [µm] zu den in Abbildung 9 beschriebenen Messzeitpunkten im Vergleich zwischen WT-Myozyten (n=22) und IRP1/IRP2-KO-Myozyten (n=27).

BL, basale Zelllängen der Myozyten [µm]; Peak, Zelllängen der Myozyten zum Zeitpunkt der maximalen Verkürzung [µm]. Unter β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin verkürzen sich die Sarkomerlängen beider Versuchsgruppen zunächst leicht unter 0,5 Hz, unter 5 Hz schließlich am stärksten. Zum Zeitpunkt des Washouts nehmen die Sarkomerlängen langsam wieder zu. Keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und IRP1/IRP2-KO. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwerte \pm SEM.

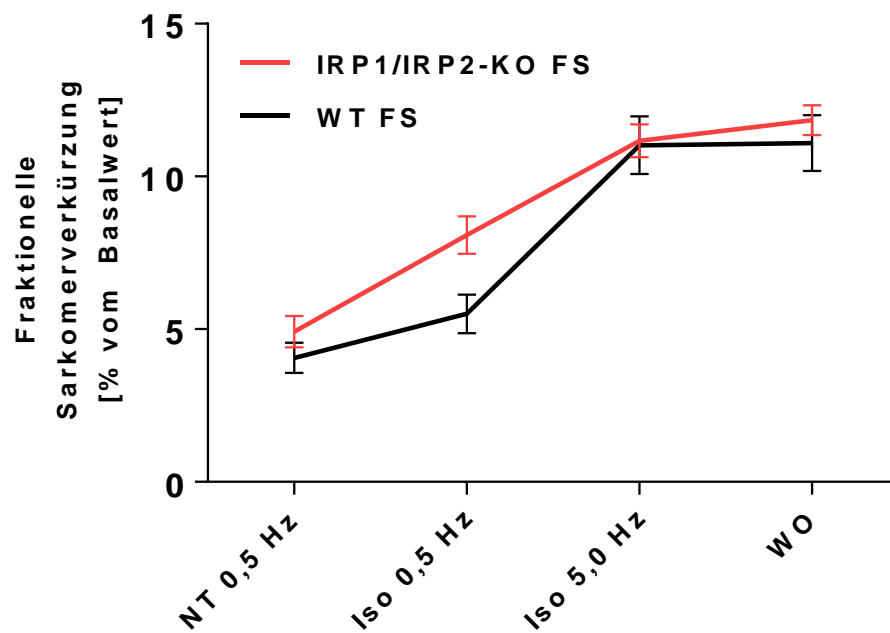


Abbildung 11: Fraktionelle Sarkomerverkürzung [Prozent vom Basalwert] im Vergleich zwischen WT-Myozyten (n=22) und IRP1/IRP2-KO-Myozyten (n=27).

FS, fraktionelle Sarkomerverkürzung. Unter β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin steigt die fraktionelle Sarkomerverkürzung beider Versuchsgruppen zunächst leicht unter 0,5 Hz, unter 5 Hz schließlich am stärksten an. Zum Zeitpunkt des Washouts bleibt die fraktionelle Sarkomerverkürzung schließlich gleich (WT) bzw. nimmt nur noch leicht zu (TG). Keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und IRP1/IRP2-KO. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwerte \pm SEM.

4.1.2 Redoxstatus von NAD(P)H/NAD(P)⁺ und FADH₂/FAD

Die Redoxstatus-Messungen von NAD(P)H/NAD(P)⁺ und FADH₂/FAD wurden gemäß des in Abbildung 9 dargestellten Protokolls durchgeführt. Hinsichtlich des Verlaufes der Autofluoreszenzen von NAD(P)H und FAD, welche sich zueinander invers verhalten, differierten Wildtyp- und IRP1/IRP2-KO-Myozyten nicht signifikant in der statistischen Auswertung. Unter Stimulation mit einer Frequenz von 0,5 Hz waren die erhobenen Werte der Autofluoreszenzen von NAD(P)H und FAD bei IRP1/IRP2-KO-Myozyten und der Kontrollgruppe vergleichbar. Die Summe aus NAD(P)H und FAD ergab insgesamt in etwa 100%. Die Wildtyp-Gruppe zeigte zu Beginn der Messungen bezüglich NAD(P)H etwa 76%ige Reduktion sowie eine 34%ige Oxidation hinsichtlich FAD, während die erstgenannten transgenen Mäuse etwa eine 75%igen Reduktion von NAD(P)H und eine 35%igen Oxidation von

FAD aufwiesen. Bei Erhöhung der Arbeitslast auf 5 Hz und gleichzeitiger β -adrenerger Stimulation durch Isoprenalin war in beiden Gruppen zunächst eine transiente Oxidation der Redoxstatus zu verzeichnen, was auf den vermehrten Verbrauch der Reduktionsäquivalente durch die erhöhte metabolische Aktivität zurückzuführen war (Wildtyp NAD(P)H ca. 60% reduziert, FAD ca. 40% oxidiert. IRP1/IRP2-KO NAD(P)H ca. 59% reduziert, FAD ca. 41% oxidiert). Im weiteren Verlauf erfolgte jedoch die Regeneration der Reduktionsäquivalente (Abbildung 12). Insgesamt ergaben sich hinsichtlich der Autofluoreszenzmessungen von NAD(P)H und FAD keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Versuchsgruppen, woraus sich ergab, dass die IRP1/IRP2-KO Gruppe unter physiologischem Stress hinsichtlich der relativen Veränderungen im Elektronenhaushalt sowie der regulatorischen metabolischen Veränderungen der Kardiomyozyten verglichen mit der Wildtyp-Gruppe kein Defizit aufwies (Abbildung 12).

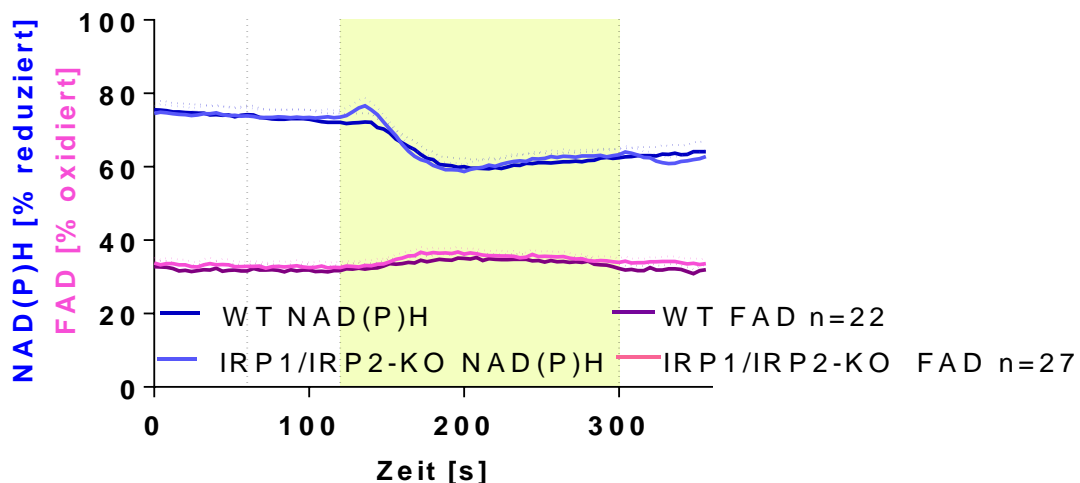


Abbildung 12: Redoxstatus von NAD(P)H und FAD [%] im Vergleich zwischen WT-Myozyten (n=22) und IRP1/IRP2-KO-Myozyten (n=27).

Durchführung der Messungen gemäß des Protokolls (Abbildung 9). Gemessen wurden die invers zueinander verlaufenden Autofluoreszenzen von NAD(P)H und FAD, welche in der Summe 100% ergeben. Die Angabe des Redoxstatus in Prozent erfolgte bezogen auf die bei der Kalibrierung am Ende der Messung ermittelten Minimal- und Maximalwerte von NAD(P)H und FAD. Letztere wurden detektiert durch Zugabe des Atmungskettenentkopplers FCCP (0% NADH, 100% FAD) sowie des Hemmstoffes von Komplex IV der Atmungskette CN (100% NADH, 0% FAD, siehe auch 3.2.1.11). Der hell hinterlegte Bereich (etwa bei 120-300 s) kennzeichnet die β -adrenerge Stimulation der Zelle mit Isoprenalin bei 5 Hz. Hier ist in beiden Gruppen eine leichte transiente Oxidation der Redoxstatus zu verzeichnen, was jedoch im weiteren Messverlauf reversibel ist. Keine signifikanten Unterschiede

zwischen WT und IRP1/IRP2-KO. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwerte \pm SEM.

Da NADH und FAD Coenzyme wichtiger Enzyme der Atmungskette wie der Isocitratdehydrogenase (IDH), der α -Ketoglutaratdehydrogenase (α -KDH) oder der Malatdehydrogenase (MDH) sind, stellt die Relation ihrer jeweiligen Fluoreszenzintensitäten einen validen und sensitiven Indikator für den Redoxstatus der Zelle dar. Daher zeigte dieser Indikator analog zu unseren Beobachtungen hinsichtlich der Redoxstatus-Messungen ebenfalls die transiente Oxidation unter β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin bei 5 Hz mit einem erhöhten Verbrauch der Redoxäquivalente als Zeichen für erhöhte metabolische Aktivität an. Zwischen der Ratio der Wildtyp-Gruppe und der Ratio der IRP1/IRP2-KO-Gruppe ließen sich keine signifikanten Unterschiede detektieren (Abbildung 13).

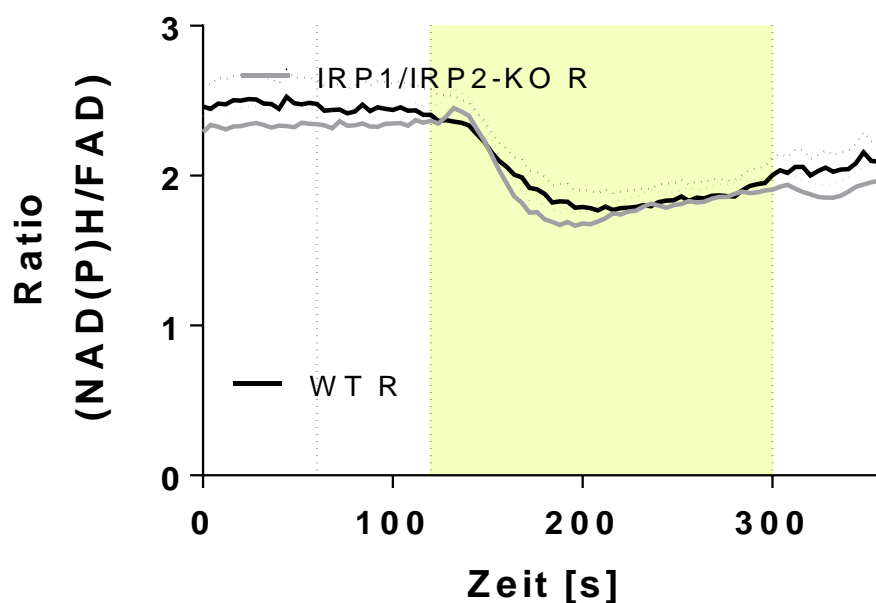


Abbildung 13: Relation der Autofluoreszenzintensitäten von NAD(P)H/FAD, welche zueinander invers verlaufen. Zunächst ist die Relation von NAD(P)H/FAD bei beiden Versuchsgruppen unter basalen Bedingungen bei Stimulation mit 0,5 Hz konstant. Der beige hinterlegte Bereich (etwa bei 120-300 s) kennzeichnet die β -adrenerge Stimulation der Zelle mit Isoprenalin bei 5 Hz; hier erfolgt in beiden Versuchsgruppen die bereits oben beschriebene transiente Oxidation des Redoxstatus durch Verbrauch der Reduktionsäquivalente. Letztere werden in beiden Versuchsgruppen im Verlauf wieder regeneriert. Keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und IRP1/IRP2-KO. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwerte \pm SEM.

4.1.3 Messungen zur Bestimmung von ROS mittels DCF

Die Messungen zur Detektion der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) erfolgten mithilfe des Farbstoffes DCF. Der Messverlauf entsprach dem in Abbildung 9 dargestellten Protokolls, wobei die Kardiomyozyten zuvor mit dem Farbstoff DCF inkubiert wurden (siehe 3.2.1.3, 3.2.1.12). Die Intensität des DCF-Signals lag bei der Wildtyp-Gruppe im Mittel bei etwa 2650 mV, bei der IRP1/IRP2-KO-Gruppe etwas tiefer bei etwa 1980 mV, was eine leichtgradig ausgeprägtere Farbstoff-Beladung der Wildtyp-Zellen anzeigte (Abbildung 14).

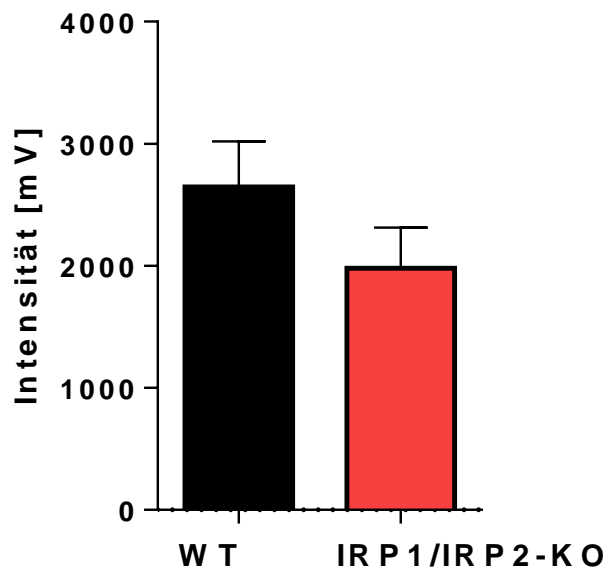


Abbildung 14: Intensitäten des DCF-Signals [mV] im Vergleich von WT-Myozyten (n=21) und IRP1/IRP2-KO-Myozyten (n=19).

Das DCF-Signal der Wildtyp-Gruppe war im Mittel mit 2650 mV leicht ausgeprägter als das der IRP1/IRP2-KO-Gruppe mit 1980 mV, insgesamt ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwerte \pm SEM.

Der Verlauf des DCF-Signals ist ein indirekter Indikator für die Menge des während des Protokolls gebildeten H_2O_2 (siehe 3.2.1.12). Aus diesem Grunde wurde am Ende jeder Messung eine Positivkontrolle für die Farbstoffbeladung der Kardiomyozyten durch Zugabe von externem H_2O_2 durchgeführt, woraufhin bei suffizienter DCF-Beladung der Zelle ein enormer Anstieg des Signals zu verzeichnen war. Die Entwicklung des DCF-Signals

im Laufe des Messprotokolls ergab insgesamt keine signifikanten Unterschiede zwischen der Wildtyp-Gruppe und der IRP1/IRP2-KO-Gruppe. Die DCF-Signale beider Gruppen stiegen im Messverlauf an, am deutlichsten unter β -adrenerger Stimulation durch Isoprenalin bei 5 Hz. Hier stieg Δ DCF bei der Wildtyp-Gruppe von 1,1 bei Beginn der β -adrenergen Stimulation auf 1,3, bei der transgenen Gruppe von 1,2 auf 1,6. Somit war Δ DCF (F/F_0) für die Gruppe der transgenen Tiere etwas größer als für die Wildtyp-Gruppe, was auf eine in der IRP1/IRP2-KO-Gruppe leicht, jedoch nicht signifikant erhöhte ROS-Bildung hindeutete (Abbildung 15).

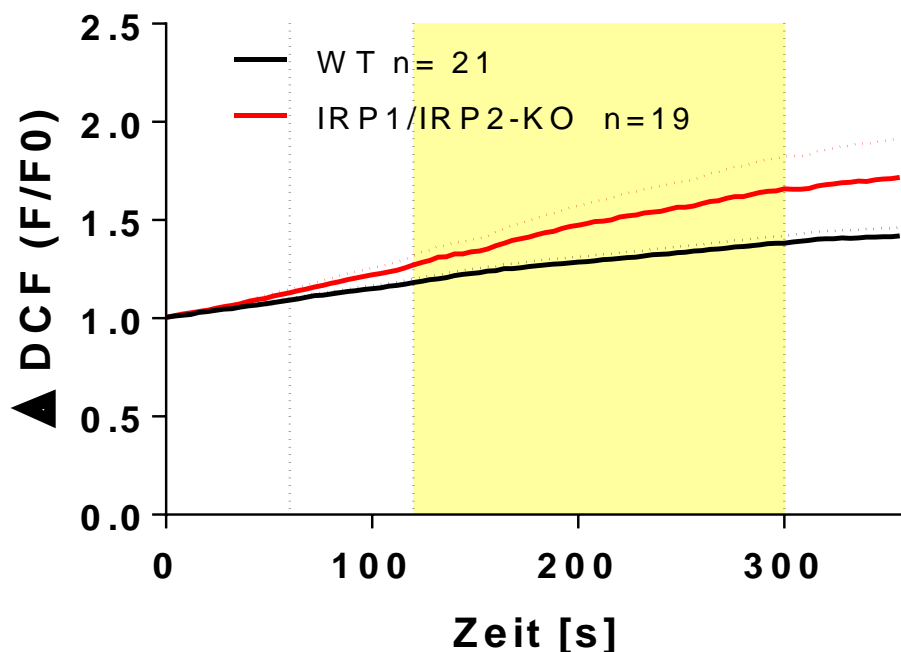


Abbildung 15: Verlauf des DCF-Signals im Vergleich von WT-Myozyten (n=21) und IRP1/IRP2-KO-Myozyten (n=19).

Leichter Anstieg des DCF-Signales bei beiden Versuchsgruppen, wobei Δ DCF (F/F_0) der IRP1/IRP2-KO-Gruppe etwas größer ist (0,4) als Δ DCF (F/F_0) der Wildtyp-Gruppe (0,2). Keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und IRP1/IRP2-KO. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwerte \pm SEM.

4.2 Ergebnisse der Versuchsreihe an Mitochondrien

4.2.1 Messungen zur Bestimmung mitochondrialer Atmung

Die Atmungsmessungen an isolierten Mitochondrien dienten zur Überprüfung der Intaktheit der Atmungskette. Hierzu erfolgte die Messung mitochondrialer Atmung bei subphysiologischer, physiologischer sowie maximaler ADP-Konzentration. Durch Zugabe von Pyruvat/Malat wurde die state 2 Atmung induziert. Dies bedeutete, dass nun ein Substrat vorhanden war (ein sogenannter „Push“-Zustand vorlag), wodurch im Citratzyklus maximal NADH gebildet wurde. Der Sauerstoffverbrauch in beiden Versuchsgruppen stieg auf etwa 32 mmol O₂/mg Protein*min, war aber vergleichsweise noch gering, was darauf hindeutete, dass die Mitochondrien noch nicht entkoppelt waren. Im weiteren Messverlauf stiegen der Sauerstoff sowie der NADH-Verbrauch konzentrationsabhängig an; dies bezeichnete den state 3 (einen sogenannten „Pull“-Zustand). ADP fungiert in der Zelle gleichsam als Hauptregulator der Atmungskette: ist durch eine verstärkte Atmung eine hohe ADP-Konzentration im Zytosol vorhanden, zeigt dies einen Energiemangelzustand an, woraufhin konsekutiv der Elektronenfluss an der Atmungskette erhöht und die ATP-Produktion hochreguliert werden (siehe 2.1.11). Je mehr ADP also im Messverlauf zugegeben wurde, desto größer wurden auch die mitochondriale Atmung sowie der O₂-Verbrauch, welcher im Verlauf auf bis zu 233 mmol O₂/mg Protein*min (WT) bzw. 226 mmol O₂/mg Protein*min (TG) anstieg. Mit Zugabe von Oligomycin, welches als Inhibitor der ATP-Synthase an Komplex V der Atmungskette fungiert und somit durch Verhinderung der weiteren Protonenübertragung den O₂-Verbrauch der Mitochondrien senkt, wurde der state 4 induziert, in dem die mitochondriale Atmung wieder auf einen Sauerstoffverbrauch von etwa 25 mmol O₂/mg Protein*min zurückging (was funktionell dem state 2 ähnlich war, da auch hier kein ATP gebildet wird). Hinsichtlich der Qualität mitochondrialer Atmung durch deren Sauerstoffverbrauch und der Intaktheit der Atmungskette ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Wildtyp- und der IRP1/IRP2-KO-Versuchsgruppe, was bedeutete, dass die Tiere letzterer die

ATP-Bildung an der Atmungskette gleich effizient durchführen konnten und somit kein Atmungskettendefekt vorlag (Abbildung 16).

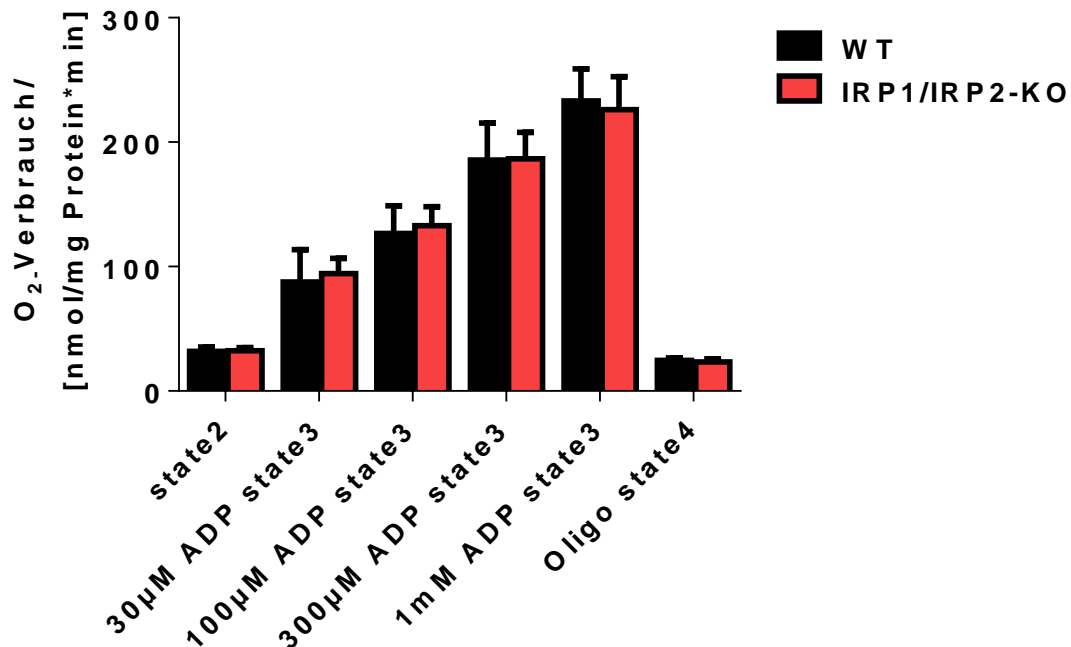


Abbildung 16: Mitochondrialer Sauerstoffverbrauch [nmol O₂/mg Protein*min] im Vergleich von WT-Mitochondrien (n=4) und IRP1/IRP2-KO-Mitochondrien (n=6).

Nahezu identische Werte im Vergleich beider Versuchsgruppen. Der Anstieg des O₂-Verbrauchs erfolgte proportional zur zugegebenen ADP-Konzentration: je mehr ADP zugegeben wurde, desto größer wurde der Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien. Nach Zugabe von Oligomycin (Inhibitor von Komplex V der Atmungskette) Rückgang der mitochondrialen Atmung. Keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und IRP1/IRP2-KO. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwerte ± SEM.

Weiterhin erfolgte die Betrachtung des respiratorischen Quotienten (RQ). Hierbei wurden einerseits state 3 und state 2 sowie andererseits state 3 und state 4 ins Verhältnis gesetzt. Je größer die zugegebene ADP-Konzentration und folglich der mitochondriale O₂-Verbrauch, desto größer der resultierende Quotient. Auch hier ergaben sich analog zu den oben beschriebenen Ergebnissen nahezu identische Werte für die WT- und die IRP1/IRP2-KO-Gruppe (Abbildung 17), woraus wir schlussfolgerten, dass die Mitochondrien der transgenen Tiere verglichen mit denen der Kontrollgruppe keine Defizite hinsichtlich der mitochondrialen Atmung aufwiesen.

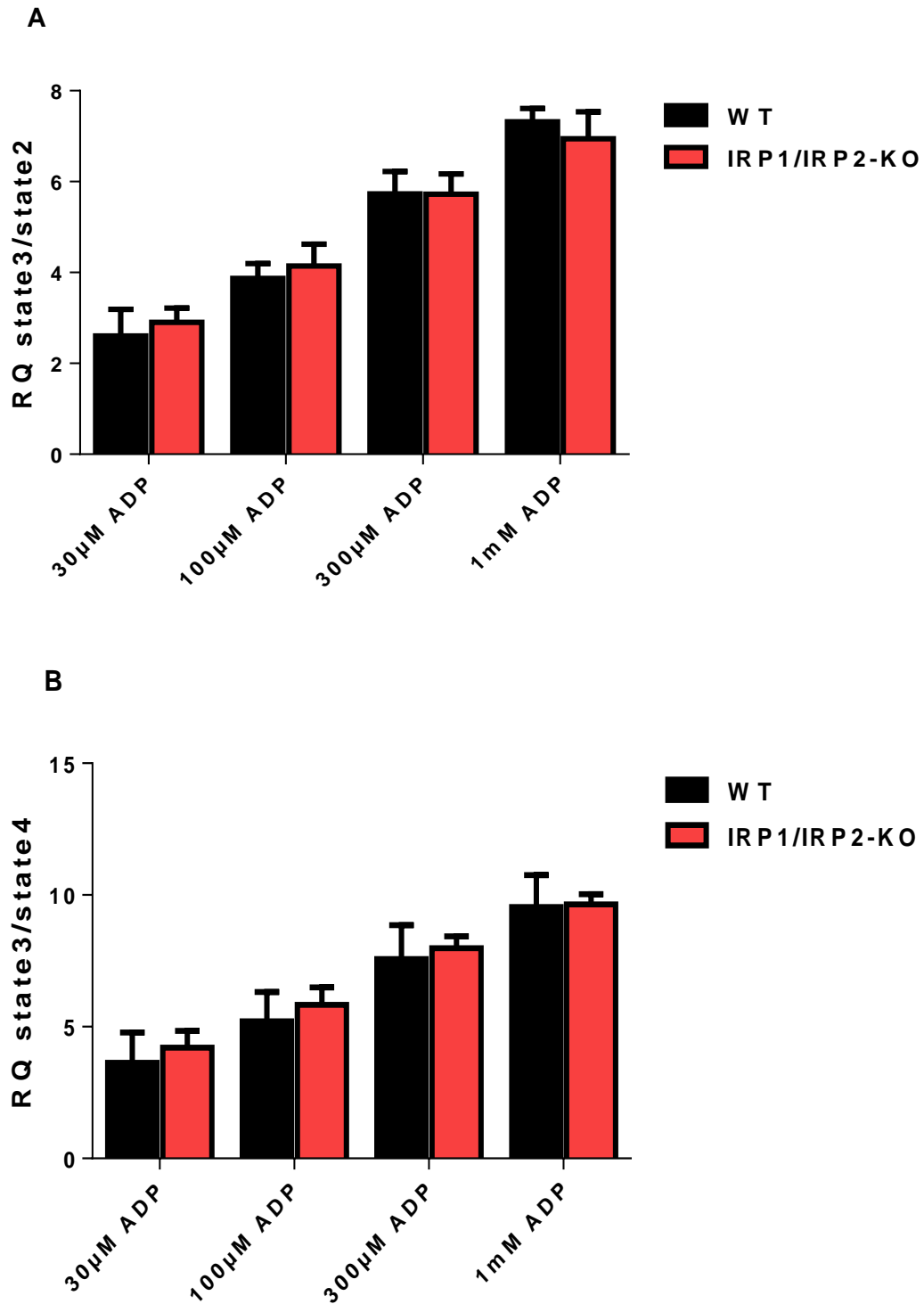


Abbildung 17: Respiratorischer Quotient (RQ) in WT-Mitochondrien (n=4) und IRP1/IRP2-KO-Mitochondrien (n=6).

A) Respiratorischer Quotient aus state 3/state 2. **B)** Respiratorischer Quotient aus state 3/state 4 (= Oligomycin). Anstieg der respiratorischen Quotienten proportional zur steigenden ADP-Konzentration. Keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und IRP1/IRP2-KO. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwerte \pm SEM.

4.2.2 Messungen der mitochondrial emittierten Superoxidradikale mittels elektro-paramagnetischer Resonanzmessung

Die elektro-paramagnetische Resonanzmessung diente der Detektion der mitochondrial emittierten Superoxidradikale. Durch das mit den entstandenen Radikalen reagierende CMH (1-Hydroxy-3-Methoxycarbonyl-2, 2, 5, 5-Tetramethylpyrrolidin) konnte über die Quantifizierung der im Messverlauf entstandenen CM-Radikale Rückschlüsse auf die $\bullet\text{O}_2^-$ -Produktion gezogen werden. Die Durchführung des Protokolls erfolgte wie in Kapitel 3.2.2.6 beschrieben. Die Zugabe von Antimycin A am Ende der Messreihe pro Genotyp diente zur Positivkontrolle. In der Gegenwart von Pyruvat/Malat als Substrat der Atmungskette war die $\bullet\text{O}_2^-$ -Produktion am stärksten. Dies ist dadurch zu erklären, dass die Atmungskette in der Gegenwart von Substrat (und somit auch der Elektronenlieferanten NADH und FADH_2), aber der Abwesenheit von ADP stark reduziert ist, da nur ein minimaler Elektronenfluss zustande kommt, und im reduzierten Zustand der Atmungskette diese Elektronen eher von den Komplexen (insbesondere I und III) nicht-enzymatisch O_2 zu $\bullet\text{O}_2^-$ reduzieren. Nach Zugabe von ADP, was am ehesten der physiologischen Situation einer arbeitenden Herzmuskelzelle entspricht, kam es zu einer Abnahme der $\bullet\text{O}_2^-$ -Produktion. Diese Abnahme erklärt sich am ehesten dadurch, dass in der Gegenwart von ADP der Elektronenfluss zunimmt und der Redoxstatus der Atmungskette damit oxidiert. Dies reduziert die Wahrscheinlichkeit aberranter Elektronen-Leckage (und somit $\bullet\text{O}_2^-$ -Generation) zugunsten der enzymatischen Reduktion von O_2 zu H_2O am Komplex IV, bei der physiologischerweise kein $\bullet\text{O}_2^-$ entsteht (siehe 2.1.11). Durch Zugabe von Antimycin A kommt es zu einem Block im Komplex III der Atmungskette, was eine vermehrte $\bullet\text{O}_2^-$ -Produktion am sogenannten Q-Zyklus provoziert. Dementsprechend nahm die $\bullet\text{O}_2^-$ -Produktion in der Gegenwart von Antimycin A wieder zu. Unter allen Bedingungen bestanden keine Unterschiede in der $\bullet\text{O}_2^-$ -Produktion zwischen IRP1/IRP2-KO und Wildtyp-Mitochondrien (Abbildung 18).

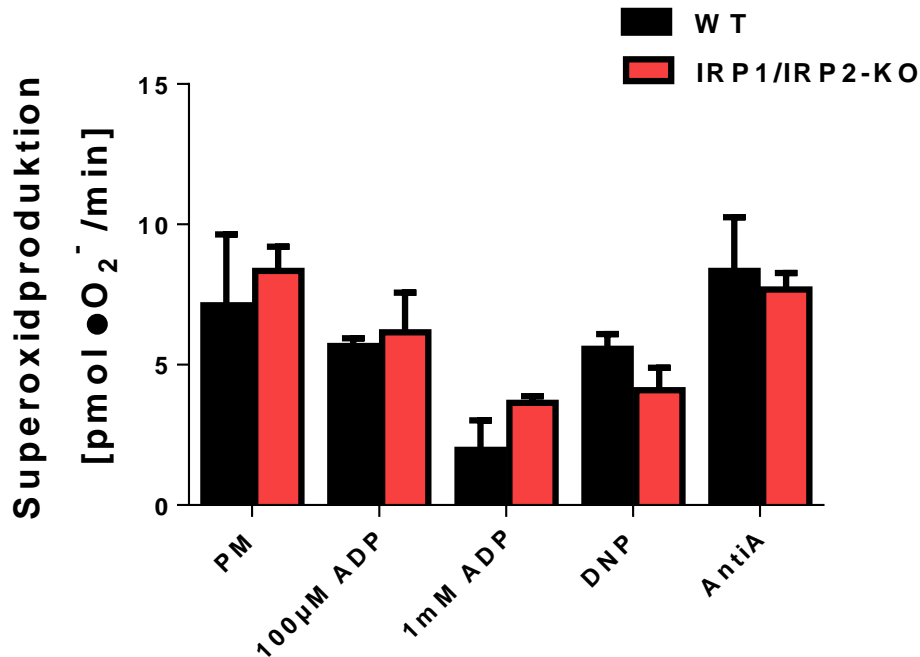


Abbildung 18: Superoxidproduktion [pmol •O₂⁻/min] im Vergleich von WT-Mitochondrien (n=3) und IRP1/IRP2-KO-Mitochondrien (n=5).

Unter der PM-Bedingung war tendenziell die höchste Neigung zur Superoxidproduktion bei beiden Versuchsgruppen zu quantifizieren, in der transgenen Gruppe etwas deutlicher als bei der Kontrollgruppe. Unter Zugabe von ADP war die •O₂⁻-Emission bei beiden Gruppen weniger stark ausgeprägt, auch hier in der IRP1/IRP2-KO-Gruppe stärker als in der Wildtyp-Gruppe. Unter der DNP- und Antimycin A-Bedingung war in beiden Gruppen ein Anstieg der Superoxidproduktion zu verzeichnen, diesmal in der Wildtyp-Gruppe stärker als in der transgenen Gruppe. Insgesamt keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und IRP1/IRP2-KO. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwerte ± SEM.

4.2.3 Messungen zur Bestimmung der extramitochondrialen H₂O₂.

Emission mittels Amplex Ultra-Red-Assay

Mithilfe des Amplex Ultra-Red-Assays konnte die H₂O₂-Emission der Mitochondrien quantifiziert und beurteilt werden. Der Ablauf der Messungen erfolgte wie in Kapitel 3.2.2.5 beschrieben. Neben den analog zu den Messungen der mitochondrialen Atmung durchgeführten Bedingungen erfolgte zusätzlich die Detektion von H₂O₂ in Anwesenheit des Atmungskettenentkopplers DNP sowie des Inhibitors von Komplex III, Antimycin A, als Positivkontrolle. In der Abwesenheit von Substrat (state 1; Mitochondrien) war die H₂O₂-Emission aufgrund des weitgehenden Fehlens von Elektronen gering. Nach Zugabe von Pyruvat/Malat (state 2) nahm die

H₂O₂-Emission deutlich zu. Diese erklärt sich durch die bereits beschriebene Reduktion der Atmungskette, die eine aberrante •O₂⁻-Produktion wahrscheinlich macht. Gleichzeitig wird durch die Zugabe von Substrat jedoch auch der NADPH-Pool reduziert, was eine optimale H₂O₂-entgiftende Kapazität der Matrix hervorruft. Die hier gemessenen H₂O₂-Moleküle werden extramitochondrial detektiert, daher berichten die H₂O₂-Werte die Konzentrationen nach Produktion und Elimination in Mitochondrien (Netto Emission). Somit ist trotz optimaler Reduktion des NADPH-Pools die H₂O₂-Emission aufgrund der dominierenden •O₂⁻-Produktion hoch. Nach Zugabe von ADP wird die •O₂⁻-Produktion deutlich gesenkt (Abbildung 16). Im Gegensatz dazu nimmt die H₂O₂-Emission nur gering, aber nicht signifikant ab. Dies erklärt sich durch die ADP-induzierte Oxidation auch des antioxidativen NADPH, wodurch trotz sinkender •O₂⁻-Produktion die Netto H₂O₂-Emission nicht abnimmt. Durch die Zugabe von DNP wird der Elektronenfluss an der Atmungskette maximal beschleunigt, was einerseits durch Oxidation der Atmungskette die •O₂⁻-Produktion deutlich senkt, aber auch die NADPH-abhängige Entgiftungsfähigkeit von H₂O₂. Daher nimmt auch unter DNP die H₂O₂-Emission kaum ab. Im Gegensatz dazu führt Antimycin A, welches die •O₂⁻-Produktion maximiert, auch zu einer deutlichen Zunahme der H₂O₂-Emission. Da diese Zunahme noch deutlich die Zunahme von •O₂⁻ übersteigt, ist davon auszugehen, dass in Mitochondrien •O₂⁻ sehr effektiv durch die Mn-SOD zu H₂O₂ dismutiert wird, sodass zwar kaum Anstiege von •O₂⁻, aber deutlich von H₂O₂ detektiert werden. Unter allen Bedingungen gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen IRP1/IRP2-KO und Wildtyp Mitochondrien (Abbildung 19).

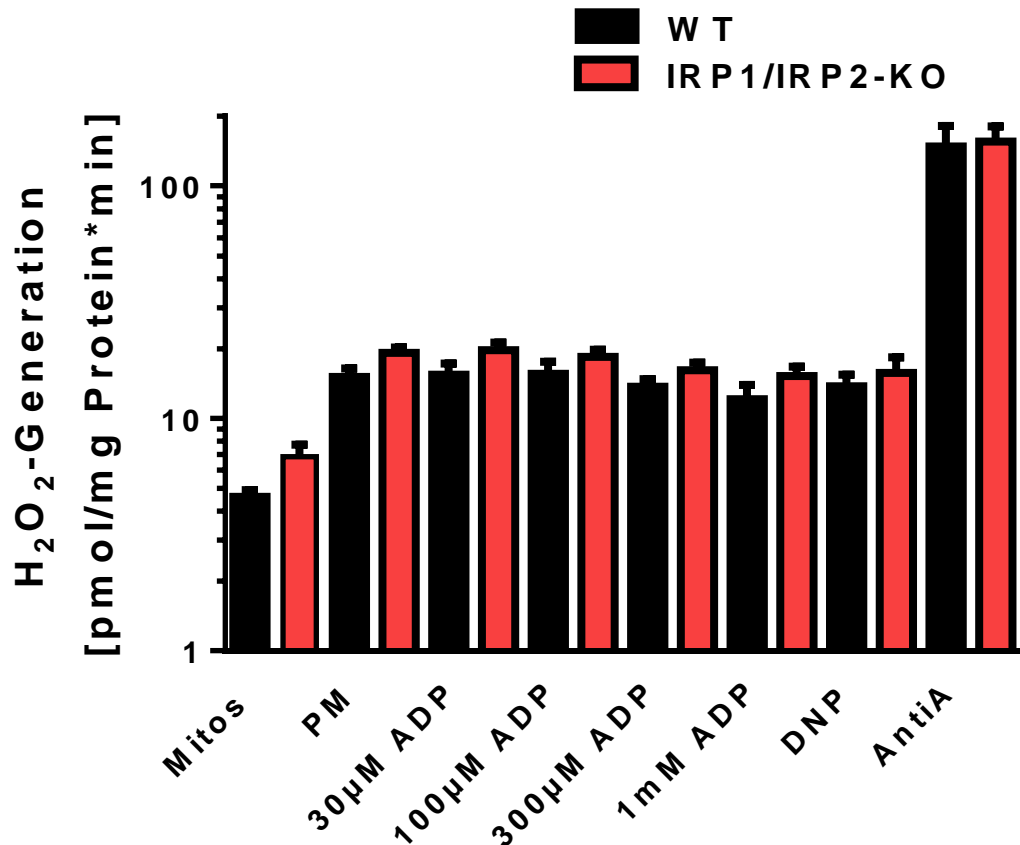


Abbildung 19: H_2O_2 -Emission [pmol/mg Protein*min] im Vergleich von WT-Mitochondrien (n=4) und IRP1/IRP2-KO-Mitochondrien (n=6).

Unter PM-Zugabe war tendenziell die höchste H_2O_2 -Emission bei beiden Versuchsgruppen festzustellen, unter Zugabe von ADP war diese weniger stark ausgeprägt. Die Gruppe der transgenen Tiere zeigte einen leichten Trend zur vermehrten H_2O_2 -Emission gegenüber der Kontrollgruppe. Zugabe von Antimycin A als Positivkontrolle. Insgesamt jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und IRP1/IRP2-KO. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwerte \pm SEM.

4.2.4 Enzymmessungen

Die Messungen dienten zur Quantifizierung der Aktivitäten einiger wichtiger Schlüsselenzyme des Citratzyklus (TCA). Die Integrität des letztgenannten ist insbesondere vom Vorhandensein von Eisen-Schwefel-Cluster-Gerüstproteinen in verschiedenen TCA-Enzymen abhängig. Von besonderer Bedeutung ist dahingehend zunächst die Aconitase, die im mitochondrialen Citratzyklus die Dehydratation von Citrat zu cis-Aconitat und dessen Hydratation zu Isocitrat katalysiert (Tong and Rouault 2007). Aufgrund der Tatsache, dass die Funktion der Aconitase also auf intakte Eisen-Schwefel-Cluster-Gerüstproteine in ihrem Aufbau angewiesen ist, war davon

auszugehen, dass im Falle eines gestörten Eisenstoffwechsels in der Zelle auch die Funktion der mitochondrialen Aconitase beeinträchtigt sein muss. Tatsächlich war letztere bei der IRP1/IRP2-KO-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe leicht, jedoch nicht signifikant vermindert (WT 0,038 U/mg*min, TG 0,031 U/mg*min; Abbildung 21A). Die Aktivität der zytosolischen Aconitase war deutlich geringer als die der mitochondrialen, allerdings auch nicht unterschiedlich zwischen den Gruppen. Ebenso verhielt es sich mit den Aktivitäten der mitochondrialen und zytosolischen Isocitrat-(IDH) und der mitochondrialen α -Ketoglutaratdehydrogenase (α -KGDH), deren Aktivitäten in WT und IRP1/IRP2-KO-Mitochondrien nicht signifikant unterschiedlich waren (Abbildung 21B, C). Auch die Aktivität der Malatdehydrogenase (MDH) war nicht unterschiedlich zwischen den Genotypen und etwas geringer im Zytosol als in Mitochondrien. Zusammenfassend ergaben sich auch hinsichtlich der Aktivitäten wichtiger und Eisen-abhängiger Citratzyklus-Enzyme keine signifikanten Unterschiede zwischen IRP1/IRP2-KO- und Wildtyp-Mitochondrien (Abbildung 20).

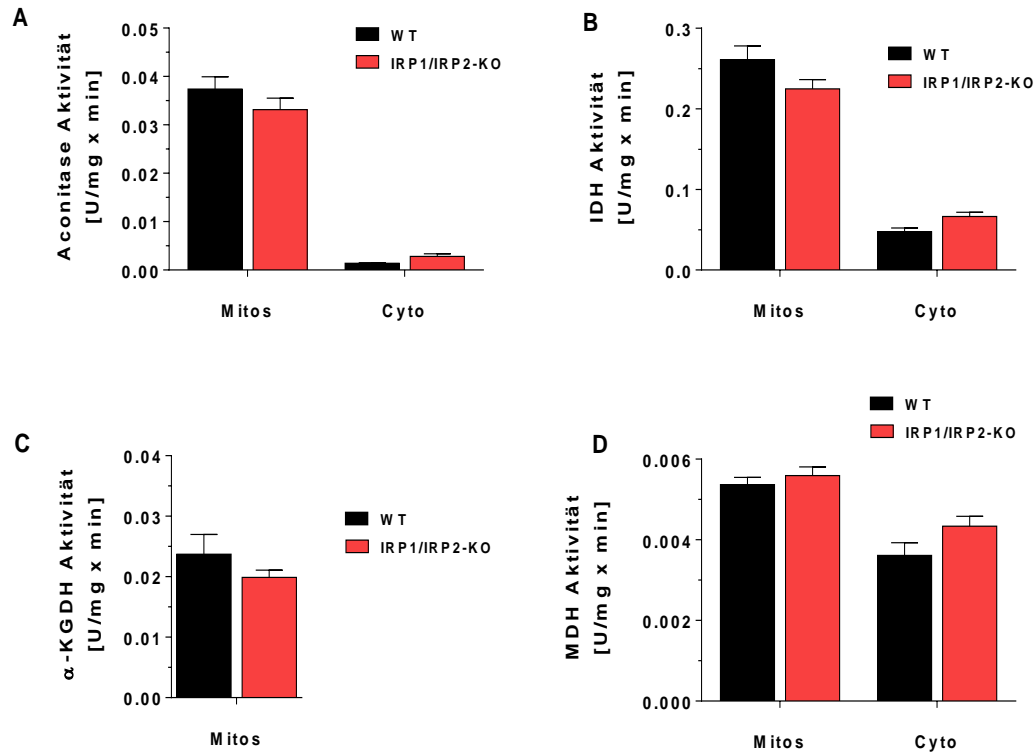


Abbildung 20: Enzymaktivitäten [U/mg*min] wichtiger Citratzyklus-Enzyme im Vergleich von WT-Mitochondrien (n=8) und IRP1/IRP2-KO-Mitochondrien (n=12).

A), Aconitase. Mitochondrial leicht verminderte, zytosolisch leicht gesteigerte Enzymaktivität in der IRP1/IRP2-KO-Gruppe verglichen mit der Wildtyp-Gruppe. **B), Isocitratdehydrogenase.** Mitochondrial leicht verminderte, zytosolisch leicht gesteigerte Enzymaktivität in der IRP1/IRP2-KO-Gruppe verglichen mit der Wildtyp-Gruppe. **C), α -Ketoglutarat-Dehydrogenase** (nur mitochondrial exprimiert). Leicht verminderte Enzymaktivität in der IRP1/IRP2-KO-Gruppe verglichen mit der Wildtyp-Gruppe. **D), Malatdehydrogenase.** Mitochondrial leicht gesteigerte, zytosolisch leicht verminderte Enzymaktivität in der IRP1/IRP2-KO-Gruppe verglichen mit der Wildtyp-Gruppe. Insgesamt keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und IRP1/IRP2-KO. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwerte \pm SEM.

4.2.5 Messungen zur Entwicklung des NAD(P)H-Pools

Aufgrund der Tatsache, dass die Messungen im gesamtzellulären Kontext hinsichtlich des Redoxstatus der Kardiomyozyten keine Unterschiede zwischen der Wildtyp- und der IRP1/IRP2-KO-Gruppe gezeigt hatten (siehe 4.1.2), sollte nun die Messung der Entwicklung des NAD(P)H-Pools an isolierten Mitochondrien verifizieren, ob in diesem Zellorganell diesbezüglich eine Defizienz der IRP1/IRP2-KO-Gruppe vorlag, welche womöglich bei den gesamtzellulären Messungen kompensiert werden konnte. Den Coenzymen

NADH und NADPH kommt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des sogenannten „redox-optimierten ROS-Gleichgewichtes“ zu. Bei erhöhter Arbeitslast werden der Elektronenfluss und der O_2 -Verbrauch der Zelle erhöht, woraufhin ihr Redoxstatus oxidiert. Die entstandenen $\bullet O_2^-$ -Radikale werden über die Mn-SOD zu H_2O_2 umgewandelt, woraufhin dieses, katalysiert durch die Glutathionperoxidase (GPX) sowie Peroxiredoxin (PRX), zu Wasser entgiftet wird. Die Regeneration von GPX und PRX erfolgt durch Thioredoxin (TRX) sowie Glutathion (GSH), die wiederum von NADPH reduziert werden. Das letztgenannte hat seinen Ursprung bei Enzymen des Citratzyklus, nämlich bei der $NADP^+$ -abhängigen Isocitratdehydrogenase (IDP_m), der Malatdehydrogenase sowie der Nicotinamid-Nukleotid-Transhydrogenase (Nnt) (Ying 2008). Befindet sich die Zelle nun im Energiemangelzustand und ist NADH also vermehrt oxidiert, ist die Regeneration von NADPH und folglich die von GPX und PRX vermindert, woraus eine erhöhte H_2O_2 -Emission und oxidativer Stress für die Zelle resultieren (siehe 2.1.11, 2.1.13) (Kohlhaas, Liu et al. 2010, Bay, Kohlhaas et al. 2013). Aus diesem Grunde war es von Bedeutung, die Entwicklung des NAD(P)H-Pools unter verschiedenen ADP-Konzentrationen (30 μM , 100 μM , 300 μM , 1 mM) zu beobachten und unter beiden Gruppen zu vergleichen. Bei jeder ADP-Bedingung fand eine Doppelbestimmung statt. Als Kontrolle erfolgten über den Messverlauf verteilt die Zugabe von PM (Endkonzentration final: 5 mM), ADP (Endkonzentration final: 1 mM) und zur Kalibrierung die Zugabe von CN (Endkonzentration final: 2,5 mM) sowie DNP (Endkonzentration final: 250 μM).

Hinsichtlich der NAD(P)H-Regeneration ergaben sich unter allen 4 ADP-Konzentrationen für beide Versuchsgruppen vergleichbare Werte. Bei Zugabe von PM war sowohl in der Wildtyp- als auch in der IRP1/IRP2-KO-Gruppe erwartungsgemäß ein Anstieg des NAD(P)H-Pools von $\leq 50\%$ auf fast 100% zu beobachten. Erst bei Zugabe von ADP war die Oxidation von NAD(P)H auf Werte um 60% - 70% zu verzeichnen. Dies ist damit zu erklären, dass die Anwesenheit von ADP den Elektronenfluss an der Atmungskette beschleunigt und hierüber NADH und (über die reverse NNT Reaktion) auch NADPH vermehrt oxidieren. Zur Kalibrierung der Messungen

erfolgte die Zugabe von CN (NAD(P)H 100%) sowie von DNP (NAD(P)H 0%). Insgesamt ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Wildtyp- und der IRP1/IRP2-KO-Gruppe, woraus wir schlussfolgerten, dass die Tiere der transgenen Gruppe hinsichtlich der Regeneration von NAD(P)H im Vergleich zur Kontrollgruppe kein Defizit aufwiesen (Abbildung 21).

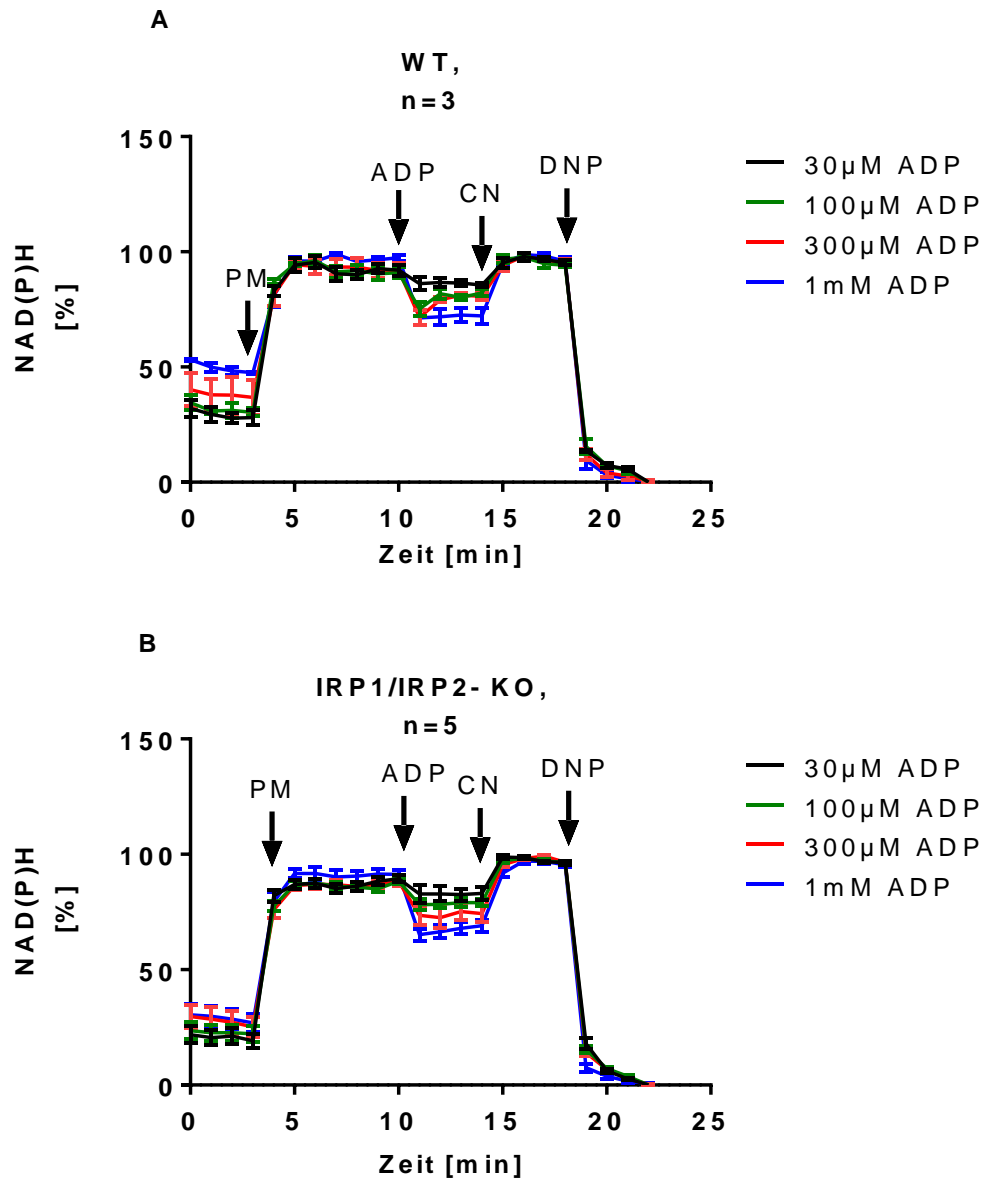


Abbildung 21: Entwicklung der NAD(P)H-Regeneration [% of control] im Vergleich von WT-Mitochondrien (n=3) und IRP1/IRP2-KO-Mitochondrien (n=5).

Erläuterungen siehe Text. Keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp- und IRP1/IRP2-KO. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwerte \pm SEM.

5 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der kardiomyozytären Eisenbeladung auf den Energiehaushalt (Atmungskette, Citratzyklus), Redoxstatus und Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zu analysieren. In diesem Zusammenhang wurden Mäuse mit Kardiomyozyten-spezifischem Knockout der Eisen-regulierenden Proteine IRP1 und IRP2 (IRP1/IRP2-KO) verwendet. In Vorarbeiten unserer Kollaborationspartner wiesen diese einen um 30% erniedrigten kardiomyozytären Gesamt-Eisengehalt auf.

Die erste Serie von Experimenten wurde an isolierten Kardiomyozyten durchgeführt, die einer physiologischen Arbeitslaststeigerung durch eine beschleunigte elektrische Stimulation bei 5 Hz und der Gegenwart eines β -adrenergen Agonisten ausgesetzt wurden. In diesen Experimenten detektierten wir keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich Zellverkürzungsparametern, des Redoxstatus von NAD(P)H und FAD sowie (mittels des Farbstoffs DCF) der zellulären ROS-Produktion zwischen der IRP1/IRP2-KO- und der Wildtyp-Gruppe. Die zweite Serie an Experimenten wurde an isolierten kardialen Mitochondrien durchgeführt. Auch in diesen Experimenten ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Genotypen hinsichtlich Atmungskapazität, respiratorischem Quotienten, Superoxidproduktion und H_2O_2 -Emission. Die dritte Serie untersuchte die Aktivitäten wichtiger und teils Eisen-abhängiger Citratzyklus-Enzyme, wie der Aconitase, der Isocitrat-, α -Ketoglutarat- und Malatdehydrogenase. Auch hier ergaben sich keine Unterschiede zwischen Wildtyp-Mitochondrien und solchen von Mäusen mit IRP1/IRP2-KO. Schließlich war auch der Redoxstatus von NAD(P)H und FAD in unterschiedlichen metabolischen Situationen (insbesondere der Abwesenheit und Gegenwart von ADP) vergleichbar zwischen beiden Gruppen.

Insgesamt zeigte sich also, dass eine zelluläre Eisendefizienz, ausgelöst durch die Kardiomyozyten-spezifische Deletion des IRP1/IRP2-Systems,

keine Auswirkungen auf die von uns untersuchten Parameter der zellulären und mitochondrialen Energetik und Funktion in Herzmuskelzellen ausübte.

Unsere Kooperationspartner, Herr Prof. Dr. Kai Wollert und Herr PD Dr. Tibor Kempf von der Medizinischen Hochschule Hannover, die uns freundlicherweise das untersuchte Mausmodell zur Verfügung gestellt hatten, hatten zuvor bei diesen Tieren nach einem Myokardinfarkt einen für das Syndrom der Herzinsuffizienz charakteristischen Phänotyp beobachtet, welcher sich im Vergleich zu Kontrolltieren (ebenfalls nach Myokardinfarkt) durch eine schlechtere funktionelle aerobe Kapazität (FAC), linksventrikuläre Dilatation, kardiomyozytäre Hypertrophie und gesteigerte Mortalität der Tiere auszeichnet. Zudem entwickelten Tiere der transgenen Versuchsgruppe auch ohne Myokardinfarkt unter β -adrenerger Stimulation mit Dobutamin *in vivo* ein kontraktiles Defizit verglichen mit der Wildtyp-Gruppe. Die basale Kontraktilität und Morphologie des Herzens in der Abwesenheit eines Myokardinfarktes oder β -adrenerger Stimulation war somit unverändert (Kempf 2013).

Galy et al. hatten festgestellt, dass Mäusen mit einem *Hepatozyten*-spezifischen IRP1/IRP2-KO bereits basal (ohne zusätzlichen Stress) einen krankhaften Phänotyp mit ausgeprägter Mitochondriopathie und gesteigerter Sterblichkeit aufwiesen (Galy 2010). Basierend auf diesen Voruntersuchungen erwarteten wir auch bei einem *Kardiomyozyten*-spezifischem Knockout von IRP1 und IRP2 eine mitochondriale und möglicherweise auch kontraktile Dysfunktion der Herzmuskelzellen. Genau wie bei den Experimenten Galys lag das von uns verwendete Mausmodell unter *basalen* Bedingungen vor und stellte kein Stressmodell dar, bei welchem die Tiere zuvor *in vivo* einer erhöhten Vor- oder Nachlast ausgesetzt worden wären. Weiterhin hatte sich in unserer Versuchsreihe an isolierten Mitochondrien gezeigt, dass sich selbst unter maximaler ADP-Gabe, welche eine hohe Arbeitslast simuliert, zwischen beiden Gruppen keine Unterschiede hinsichtlich der Atmungskapazität und der mitochondrialen Energetik im Gesamten einstellten. Dahingegen hatte sich in den Beobachtungen der Arbeitsgruppe von Bruno Galy im Bezug auf das

Hepatozyten-spezifische IRP1/IRP2-KO-Mausmodell bereits unter *basalen* Bedingungen eine deutliche mitochondriale Dysfunktion in der transgenen Gruppe gezeigt. Während letztere, wie oben beschrieben, verglichen mit der *Hepatozyten*-gesunden Kontrollgruppe bereits phänotypische Veränderungen im Sinne einer Kachexie aufwiesen, waren solche makroskopischen Unterschiede in der von uns untersuchten *Kardiomyozyten*-spezifischen transgenen Gruppe nicht festzustellen.

Weiterhin war die Überlebenszeit der transgenen Gruppe Bruno Galys stark vermindert, da die Tiere aufgrund innerer Blutungen und der Entwicklung einer Fettleber deutlich früher verstarben als die Wildtyp-Tiere mit normaler Lebenserwartung, was sich im Vergleich unserer Versuchsgruppen mit normaler Lebenserwartung ebenfalls nicht beobachten ließ. Darüber hinaus zeigten sich auch auf biochemischer Ebene deutliche Differenzen zwischen dem von uns verwendeten Mausmodell und dem Galys. Während unsere *Kardiomyozyten*-spezifischen IRP1/IRP2-defizienten Tiere unter maximaler ADP-Gabe verglichen mit unserer gesunden Kontrollgruppe hinsichtlich der Atmungskapazität keine Einbußen verzeichneten, wiesen unter denselben Versuchsbedingungen die Komplexe I, II und III der Atmungskette in der Gruppe der *Hepatozyten*-spezifischen IRP1/IRP2-KO-Tiere im Vergleich zur zugehörigen Wildtyp-Gruppe deutlich reduzierte Aktivitäten und somit eine insgesamt verminderte Atmungskapazität auf.

Ähnliches ließ sich in Galys Versuchen bei der transgenen Gruppe für bestimmte Citratzyklus-Enzyme herausarbeiten, wo die Aktivitäten von Oxoglutaratdehydrogenase, Citratsynthase, Pyruvatdehydrogenase, Fumarase und Malatdehydrogenase verglichen mit der Kontrollgruppe deutlich erniedrigt waren. Wie auch schon in Bezug auf die Atmungskapazität war eine solche Beobachtung in unseren Versuchen bei den transgenen Kardiomyozyten nicht zu beschreiben, wo im Vergleich zur Wildtyp-Gruppe lediglich die Aktivitäten der mitochondrialen Aconitase, der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase sowie der mitochondrialen Isocitratdehydrogenase leicht, aber nicht signifikant vermindert waren. Somit lässt sich festhalten, dass der zellspezifische IRP1/IRP-2-Knockout eine deutliche Reduktion der Aktivität

von Eisen-abhängigen Citratzyklus-Enzymen und Atmungskettenkomplexen in *Hepatozyten*, nicht aber in *Kardiomyozyten* aufweist (Galy 2010). Die Gründe für diesen deutlichen Unterschied sind derzeit unklar und werden im folgenden Abschnitt diskutiert.

Die Unterschiede unserer Beobachtungen mit den Arbeiten am *Hepatozyten*-spezifischen Knockout lassen sich zunächst möglicherweise dadurch erklären, dass die Regulation des Eisenhaushalts in Hepatozyten unterschiedlich gegenüber Herzmuskelzellen zu sein scheint und Eisen in der Leber im Vergleich zum Herzen gegebenenfalls auch andere Aufgaben erfüllen könnte. Hepatozyten könnten somit möglicherweise auf einen Eisenmangel empfindlicher reagieren als Herzmuskelzellen. Weiterhin ist es denkbar, dass eine Eisendefizienz in den *Kardiomyozyten* besser kompensiert werden kann als in *Hepatozyten*. Ein solcher Kompensationsmechanismus könnte grundsätzlich an unterschiedlichen Stellen des physiologischen Eisenstoffwechsels zum Tragen kommen: zunächst könnten die durch Hepcidin getriggerte enterale Resorption von Fe^{3+} im Bürstensaum des Darmepithels sowie die anschließende Reduktion durch die apikal membranständige enterozytäre Ferrireduktase (DyctB) zu Fe^{2+} hochreguliert sein, ebenso wie auch das durch Ferroportin bewirkte Ausschleusen des von Hephaestin oxidierten Fe^{3+} aus der Zelle. All dies würde zu einer Kompensation des Eisenmangels und einer kompensatorisch gesteigerten Verfügbarkeit von Fe^{3+} im Organismus führen. Konsekutiv könnte nun auch das Fe^{3+} bindende Transferrin sowie die an der Oberfläche der Zielzellen exprimierten Transferrinrezeptoren 1 (TfR1) einer Hochregulation unterliegen, sodass letztendlich trotz des durch den IRP1/IRP2-Knockout bedingten initialen systemischen Eisendefizits eine suffiziente Eisenbeladung der Zellen erfolgen könnte. Allerdings ist dieser theoretisch zunächst denkbare Erklärungsansatz im Falle unseres Mausmodells eher unwahrscheinlich, da die Arbeitsgruppe Tibor Kempfs zuvor in den Gesamtherzen der Knockout-Gruppe um 30% erniedrigte Eisenlevel verglichen mit der Kontrollgruppe beobachtet hatte (Kempf 2013). Allerdings wurden die mitochondrialen und zytosolischen Eisenkonzentrationen nicht unterschieden. Daher ist es zumindest nicht

ausgeschlossen, dass aufgrund der erniedrigten gesamtzellulären Eisenkonzentration die Eisenaufnahme vom Zytosol in die Mitochondrien kompensatorisch gesteigert sein könnte, was auch Ardehali et al. bei ihrem Mausmodell beobachteten (siehe unten; Khechaduri, Bayeva et al. 2013), womit zwei der von Eisen in Mitochondrien erfüllten wichtigen Funktionen gewährleistet wären; einerseits würde die Häm-Biosynthese suffizient ablaufen, weswegen die Entwicklung einer (beispielsweise bei dem Syndrom der Herzinsuffizienz häufig beobachteten) Anämie ausbleiben würde. Darüber hinaus ist unter Anwesenheit von Eisen auch die Bildung der mitochondrialen Eisen-Schwefel-Cluster-Gerüstproteine gewährleistet, die für die Integrität wichtiger Citratzyklus-Enzyme, besonders der Aconitase, unabdingbar sind. Dieser Ansatzpunkt würde daher auch erklären, warum in unseren Versuchen die Aktivität dieses stark Eisen-abhängigen Enzyms in der Versuchsgruppe der IRP1/IRP2-KO-Tiere im Vergleich zu den Wildtypen trotzdem nicht signifikant vermindert war. Weitere Experimente, die zwischen zellulärem und mitochondrialem Eisengehalt differenzieren, würden somit zur Klärung dieser Frage beitragen.

Einen weiteren möglichen Erklärungsansatz zur Kompensation des IRP1/IRP2-Knockouts bietet der in seiner genauen Rolle noch nicht ganz verstandene mitochondrial calcium uniporter (MCU). Man geht zum jetzigen Zeitpunkt davon aus, dass der MCU in der Lage ist, aufgrund derselben chemischen Wertigkeit neben Ca^{2+} auch Fe^{2+} vom Zytosol in die Mitochondrien zu schleusen. Diese Hypothese wurde erst kürzlich bestärkt, als Sripetchwandee et al. beobachteten, dass die bei dem von ihnen untersuchten Mausmodell aufgrund von mitochondrialer Dysfunktion vorliegende Eisenüberladung der Hirn-Mitochondrien unter Einsatz eines MCU-Blockers erfolgreich verhindert werden konnte (Sripetchwandee, Sanit et al. 2013). Der MCU könnte also eine wichtige Eintrittspforte für Fe^{2+} in die Mitochondrien darstellen, und zwar nicht nur im Gehirn, sondern möglicherweise auch im Herzen, wo er ebenfalls zur Kompensation verminderter Eisenspiegel beitragen könnte. Letztendlich bleibt es unklar, ob für die bei unseren IRP1/IRP2-Versuchstieren vorliegende intakte mitochondriale Energetik tatsächlich ein oder mehrere mögliche

Kompensationsmechanismen ursächlich sind; in der Summe resultieren jedoch verglichen mit der Kontrollgruppe weder eine verminderte Kontraktilität der Kardiomyozyten noch Einschränkungen der Funktionen von Citratzyklus und Atmungskette oder in der Folge eine vermehrte Produktion von Superoxiden oder ROS.

Den mit am gewichtigsten zu diskutierenden Aspekt stellt die Frage nach der letztendlichen genauen Rolle von Eisen in der Pathogenese des Syndroms der Herzinsuffizienz dar. Währenddessen deutet die aktuelle Forschungslage dahingehend mehr und mehr auf einen bestehenden Zusammenhang zwischen dem Syndrom der Herzinsuffizienz (bei dem die Kardiomyozyten einer erhöhten Vorlast ausgesetzt sind) und einem Missverhältnis im Eisenhaushalt der jeweiligen Patienten hin. Ob und in welcher Form eine solche Rolle existiert, ist aktuell Gegenstand kontroverser Diskussionen. So herrscht noch keine genaue Klarheit darüber, ob nun ein Mangel oder doch im Gegenteil eine Überladung an Eisen für die Entwicklung der Krankheit prädisponiert. Die aktuelle Studienlage bietet Werke zur Untermauerung beider Hypothesen.

So wies beispielsweise die Studie von Ardehali et al. auf eine erhöhte ROS-Produktion in Herzinsuffizienz-Kardiomyozyten bei einer zytosolischen Eisenüberladung hin. Sie beobachteten, dass die Kardiomyozyten der untersuchten Herzinsuffizienz-Patienten trotz nachgewiesenen erniedrigter *systemischer* und *zytosolischer* Häm- sowie Eisenspiegel dennoch einen erstaunlich hohen *mitochondrialen* Häm- und Eisengehalt sowie eine erhöhte Aktivität der die Hämbiosynthese regulierenden δ -Aminolaevulinat-Synthase 2 (ALAS2, siehe 2.1.9) aufwiesen. Als für die erhöhte Aktivität der ALAS2 ursächlich vermuteten Ardehali et al. eine chronische Hypoxie der Kardiomyozyten der Herzinsuffizienz-Patienten. Sowohl eine erhöhte Aktivität der δ -Aminolaevulinat-Synthase 2 wie auch die daraus resultierenden erhöhten Hämlevel waren laut Ardehali et al. mit einer gesteigerten mitochondrialen ROS-Produktion vergesellschaftet. Die aufgrund der erhöhten mitochondrialen Hämlevel konsekutiv ebenfalls erhöhten Eisenspiegel könnten ihrerseits über ein Ablaufen der Fenton-Reaktion einen

schädlichen Einfluss auf die Zellen ausüben, die ebenfalls nachgewiesenermaßen zu vermehrter Produktion von ROS führt, welche wiederum mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit zur Pathogenese und zum kardialen Remodeling bei Herzinsuffizienz beitragen. Fraglich blieb, ob die neben der Hämbiosynthese zweite wichtige Aufgabe von Eisen im Mitochondrium, die Eisen-Schwefel-Cluster-Biosynthese, trotz der suffizienten mitochondrialen Eisenbeladung reibungslos ablaufen konnte, da die Aktivitäten vereinzelter Komplexe der Atmungskette und auch die Aktivität der Aconitase, welche auf die Integrität eben dieser FeS-Cluster angewiesen sind, signifikant vermindert waren (Khechaduri, Bayeva et al. 2013). Letzteres ließ sich bei dem von uns untersuchten Mausmodell unter basalen Bedingungen nicht beobachten. Die Studie von Ardehali et al. suggeriert jedoch, dass ein Kompensationsmechanismus existieren könnte, der trotz verminderter zellulärer Eisenlevel eine erhöhte Eisenaufnahme in die Mitochondrien gewährleisten kann. Es ist möglich, dass auch bei dem uns vorliegenden Mausmodell ein solcher Mechanismus zum Tragen gekommen ist, sodass trotz um 30% verminderter zellulärer Eisenlevel in der IRP1/IRP2-KO-Gruppe kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe hinsichtlich der Zellenergetik in Form der Funktionen des Citratzyklus, der Atmungskette und der Produktion von ROS festgestellt werden konnte.

Für den umgekehrten Fall, also einen Zusammenhang zwischen dem Syndrom der Herzinsuffizienz und einem *Eisendefizit*, verifizierten Nanas et. al. in ihrer Studie die häufig bei ihren Herzinsuffizienz-Patienten diagnostizierte Anämie überwiegend als Eisenmangelanämie. Passend zu dieser Beobachtung stellten Jankowska et al. eine Eisendefizienz bei dieser Gruppe von Patienten als einen Prädiktor für ein deutlich schlechteres Outcome im Sinne einer erhöhten Mortalität fest (Jankowska, Rozentryt et al. 2010), während Anker et. al. diesbezüglich einen therapeutischen Ansatz postulierten: unter 24-wöchiger intravenöser Gabe von 200 mg Eisencarboxymaltose berichtete ein Großteil der beobachteten Patienten über eine subjektive Besserung ihrer Beschwerden bei gleichzeitiger Steigerung der Lebensqualität sowie Verbesserung ihrer NYHA-Klasse (Anker, Comin Colet et al. 2009). Eine Eisensubstitution schien also bei

(anämischen wie auch nicht-anämischen) Herzinsuffizienz-Patienten zu einer verbesserten Leistungsfähigkeit und weniger Symptomen zu führen, woraus man schlussfolgern könnte, dass ein Eisenmangel generell die Energetik des Organismus negativ zu beeinträchtigen scheint. Für unsere Studie hätte dies bedeuten können, dass hinsichtlich der Zellenergetik der IRP1/IRP2-KO-Kardiomyozyten ein schlechteres Outcome im Sinne verminderter kardiomyozytärer Kontraktilität, reduzierter Atmungskapazität oder vermehrter Produktion von ROS zu erwarten gewesen wäre.

Eine möglich Erklärung dafür, dass eben diese Beobachtungen bei unseren Experimenten ausgeblieben waren, wäre möglicherweise die Tatsache, dass die oben beschriebenen negativen Effekte eines (systemischen) Eisenmangels und umgekehrt die positiven Effekte einer therapeutischen Eisengabe nicht primär ihre Wirkung an den Kardiomyozyten entfalten, die ja bei uns das Zentrum des Eisendefizits darstellten, sondern an anderer Stelle im Organismus. So wäre es vorstellbar, dass sich ein Eisendefizit insbesondere an der Skelettmuskulatur niederschlagen und hier einen verminderten Fitnesszustand und daraus folgend schlechteren Allgemeinzustand der Patienten bewirken könnte. Im Umkehrschluss könnten auf diese Weise die positiven Auswirkungen einer Eisensubstitution dadurch erklärt werden, dass die Versuchsteilnehmer nach ausgeglichenem Eisendefizit generell von einer leistungsfähigeren Skelettmuskulatur profitieren könnten. Ähnliches wäre hinsichtlich der Eisenmangelanämie denkbar: nach Eisengabe und unter höherem Hb-Gehalt des Blutes könnte aufgrund der nun wieder vermehrt im Organismus bereitstehenden Sauerstoffträger die generelle körperliche Fitness und Leistungsfähigkeit der Patienten gebessert sein, was positive Auswirkungen auf Allgemeinzustand und Lebensqualität mit sich bringen und auch für die von Anker beschriebene Verbesserung der NYHA-Klasse ursächlich sein könnte (Anker, Comin Colet et al. 2009). Letztendlich ist also bisher nicht erwiesen, ob sich die Auswirkungen von Eisendefizit und Eisensubstitution nun primär am Herzen oder doch (zusätzlich) an anderen Organen niederschlagen (von Haehling, Jankowska et al. 2015).

In der Summe sind also verschiedene Ansätze vorstellbar, die erklären könnten, weshalb sich in den von uns durchgeführten Versuchen keine signifikanten Unterschiede zwischen IRP1/IRP2-KO-Gruppe und der Wildtyp-Gruppe eingestellt hatten. Neben den noch nicht ganz klaren und somit weiter zu spezifizierenden Auswirkungen eines gestörten Eisenhaushaltes im Körper ist weiterhin ein potentieller Kompensationsmechanismus denkbar, der trotz erniedrigter kardialer Eisenlevel eine intakte Kontraktilität sowie mitochondriale Energetik der Kardiomyozyten gewährleisten könnte. Die Funktionsweise dieses möglichen Kompensationsmechanismus wie auch der genaue Pathomechanismus zur Entwicklung des Syndroms der Herzinsuffizienz in Bezug auf gestörte zelluläre und mitochondriale Eisenlevel gilt es weiter als Gegenstand der aktuellen Forschung zu verifizieren.

5.1 Ausblick

Nach aktueller Studienlage bleibt die exakte Rolle von Eisen in der Entwicklung des Syndroms der Herzinsuffizienz nach wie vor unklar. Es verdichten sich jedoch die Anzeichen, dass eine solche Rolle zu existieren und zudem eine wichtige zu sein scheint, finden sich doch in zahlreichen Arbeiten Zusammenhänge zwischen der Entwicklung einer Herzinsuffizienz und einer gestörten Eisenverteilung in den Mitochondrien, sei es durch eine Überladung oder einen Mangel an Eisen. Es bleibt zu diskutieren, inwiefern die Aufgabe von Eisen weiter spezifiziert und in der Zukunft noch gezielter als ein therapeutischer Ansatz zur Behandlung des Syndroms der Herzinsuffizienz etabliert werden kann.

6 Literaturverzeichnis

- 1) Adam-Vizi, V. (2005). "Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources." *Antioxid Redox Signal* 7(9-10): 1140-1149.
- 2) Ajioka, R. S., J. D. Phillips and J. P. Kushner (2006). "Biosynthesis of heme in mammals." *Biochim Biophys Acta* 1763(7): 723-736.
- 3) Anderson, G. J., D. M. Frazer and G. D. McLaren (2009). "Iron absorption and metabolism." *Curr Opin Gastroenterol* 25(2): 129-135.
- 4) Anderson, G. J. and C. D. Vulpe (2009). "Mammalian iron transport." *Cell Mol Life Sci* 66(20): 3241-3261.
- 5) Anker, S. D., J. Comin Colet, G. Filippatos, R. Willenheimer, K. Dickstein, H. Drexler, T. F. Luscher, B. Bart, W. Banasiak, J. Niegowska, B. A. Kirwan, C. Mori, B. von Eisenhart Rothe, S. J. Pocock, P. A. Poole-Wilson, P. Ponikowski and F.-H. T. Investigators (2009). "Ferric carboxymaltose in patients with heart failure and iron deficiency." *N Engl J Med* 361(25): 2436-2448.
- 6) Aon, M. A., B. A. Stanley, V. Sivakumaran, J. M. Kembro, B. O'Rourke, N. Paolucci and S. Cortassa (2012). "Glutathione/thioredoxin systems modulate mitochondrial H₂O₂ emission: an experimental-computational study." *J Gen Physiol* 139(6): 479-491.
- 7) Armoundas, A. A., I. A. Hobai, G. F. Tomaselli, R. L. Winslow and B. O'Rourke (2003). "Role of sodium-calcium exchanger in modulating the action potential of ventricular myocytes from normal and failing hearts." *Circ Res* 93(1): 46-53.
- 8) Armstrong, J. S., M. Whiteman, H. Yang and D. P. Jones (2004). "The redox regulation of intermediary metabolism by a superoxide-aconitase rheostat." *Bioessays* 26(8): 894-900.
- 9) Baartscheer, A., C. A. Schumacher, M. M. van Borren, C. N. Belterman, R. Coronel and J. W. Fiolet (2003). "Increased Na⁺/H⁺-exchange activity is the cause of increased [Na⁺]_i and underlies disturbed calcium handling in the rabbit pressure and volume overload heart failure model." *Cardiovasc Res* 57(4): 1015-1024.
- 10) Babitt, J. L. and H. Y. Lin (2010). "Molecular mechanisms of hepcidin regulation: implications for the anemia of CKD." *Am J Kidney Dis* 55(4): 726-741.
- 11) Balaban, R. S., S. Nemoto and T. Finkel (2005). "Mitochondria, oxidants, and aging." *Cell* 120(4): 483-495.

- 12) Baughman, J. M., F. Perocchi, H. S. Girgis, M. Plovanich, C. A. Belcher-Timme, Y. Sancak, X. R. Bao, L. Strittmatter, O. Goldberger, R. L. Bogorad, V. Koteliansky and V. K. Mootha (2011). "Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter." *Nature* 476(7360): 341-345.
- 13) Bauriedel, G. S., Dirk; Lüderitz, Berndt (2005). "Zertifizierte medizinische Fortbildung: Die chronische Herzinsuffizienz." *Deutsches Ärzteblatt*.
- 14) Bay, J., M. Kohlhaas and C. Maack (2013). "Intracellular Na(+) and cardiac metabolism." *J Mol Cell Cardiol* 61: 20-27.
- 15) Bayeva, M., M. Gheorghiade and H. Ardehali (2013). "Mitochondria as a therapeutic target in heart failure." *J Am Coll Cardiol* 61(6): 599-610.
- 16) Bers, D. M. (2002). "Cardiac excitation-contraction coupling." *Nature* 415(6868): 198-205.
- 17) Bers, D. M. (2006). "Altered cardiac myocyte Ca regulation in heart failure." *Physiology (Bethesda)* 21: 380-387.
- 18) Bers, D. M. (2008). "Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes." *Annu Rev Physiol* 70: 23-49.
- 19) Bito, V., F. R. Heinzel, L. Biesmans, G. Antoons and K. R. Sipido (2008). "Crosstalk between L-type Ca²⁺ channels and the sarcoplasmic reticulum: alterations during cardiac remodelling." *Cardiovasc Res* 77(2): 315-324.
- 20) Bouton, C. and J. C. Drapier (2003). "Iron regulatory proteins as NO signal transducers." *Sci STKE* 2003(182): pe17.
- 21) Brennan, J. P., S. C. Bardswell, J. R. Burgoyne, W. Fuller, E. Schroder, R. Wait, S. Begum, J. C. Kentish and P. Eaton (2006). "Oxidant-induced activation of type I protein kinase A is mediated by RI subunit interprotein disulfide bond formation." *J Biol Chem* 281(31): 21827-21836.
- 22) Bundesamt, S. (2013). Diagnosedaten der Patienten und Patientinnen in Krankenhäusern (einschließlich Sterbe- und Stundenfälle) 2011.
- 23) Bundesamt, S. (2015). "Diagnosedaten der Patienten und Patientinnen in Krankenhäusern (einschl. Sterbe- und Stundenfälle) - Fachserie 12 Reihe 6.2.1 - 2013."
- 24) Burgoyne, J. R., H. Mongue-Din, P. Eaton and A. M. Shah (2012). "Redox signaling in cardiac physiology and pathology." *Circ Res* 111(8): 1091-1106.
- 25) Chen, W., P. N. Paradkar, L. Li, E. L. Pierce, N. B. Langer, N. Takahashi-Makise, B. B. Hyde, O. S. Shirihai, D. M. Ward, J. Kaplan and B. H. Paw (2009). "Abcb10 physically interacts with mitoferrin-1 (Slc25a37) to

- enhance its stability and function in the erythroid mitochondria." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(38): 16263-16268.
- 26) Chen, X. J., X. Wang, B. A. Kaufman and R. A. Butow (2005). "Aconitase couples metabolic regulation to mitochondrial DNA maintenance." *Science* 307(5710): 714-717.
 - 27) Cooperman, S. S., E. G. Meyron-Holtz, H. Olivierre-Wilson, M. C. Ghosh, J. P. McConnell and T. A. Rouault (2005). "Microcytic anemia, erythropoietic protoporphyria, and neurodegeneration in mice with targeted deletion of iron-regulatory protein 2." *Blood* 106(3): 1084-1091.
 - 28) Dai, D. F., E. J. Hsieh, Y. Liu, T. Chen, R. P. Beyer, M. T. Chin, M. J. MacCoss and P. S. Rabinovitch (2012). "Mitochondrial proteome remodelling in pressure overload-induced heart failure: the role of mitochondrial oxidative stress." *Cardiovasc Res* 93(1): 79-88.
 - 29) De Domenico, I., E. Lo, D. M. Ward and J. Kaplan (2009). "Hepcidin-induced internalization of ferroportin requires binding and cooperative interaction with Jak2." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(10): 3800-3805.
 - 30) De Stefani, D., A. Raffaello, E. Teardo, I. Szabo and R. Rizzuto (2011). "A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter." *Nature* 476(7360): 336-340.
 - 31) Despa, S., M. A. Islam, C. R. Weber, S. M. Pogwizd and D. M. Bers (2002). "Intracellular Na(+) concentration is elevated in heart failure but Na/K pump function is unchanged." *Circulation* 105(21): 2543-2548.
 - 32) Donovan, A., A. Brownlie, Y. Zhou, J. Shepard, S. J. Pratt, J. Moynihan, B. H. Paw, A. Drejer, B. Barut, A. Zapata, T. C. Law, C. Brugnara, S. E. Lux, G. S. Pinkus, J. L. Pinkus, P. D. Kingsley, J. Palis, M. D. Fleming, N. C. Andrews and L. I. Zon (2000). "Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter." *Nature* 403(6771): 776-781.
 - 33) Erickson, J. R., M. L. Joiner, X. Guan, W. Kutschke, J. Yang, C. V. Oddis, R. K. Bartlett, J. S. Lowe, S. E. O'Donnell, N. Aykin-Burns, M. C. Zimmerman, K. Zimmerman, A. J. Ham, R. M. Weiss, D. R. Spitz, M. A. Shea, R. J. Colbran, P. J. Mohler and M. E. Anderson (2008). "A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation." *Cell* 133(3): 462-474.
 - 34) Ferris, C. D., S. R. Jaffrey, A. Sawa, M. Takahashi, S. D. Brady, R. K. Barrow, S. A. Tysoe, H. Wolosker, D. E. Baranano, S. Dore, K. D. Poss and S. H. Snyder (1999). "Haem oxygenase-1 prevents cell death by regulating cellular iron." *Nat Cell Biol* 1(3): 152-157.
 - 35) Flesch, M., C. Maack, B. Cremers, A. T. Baumer, M. Sudkamp and M. Bohm (1999). "Effect of beta-blockers on free radical-induced cardiac contractile dysfunction." *Circulation* 100(4): 346-353.

- 36) Freund, T., A. Baldauf, C. Muth, J. Gensichen, J. Szecsenyi and F. Peters-Klimm (2011). "[Practice-based home visit and telephone monitoring of chronic heart failure patients: rationale, design and practical application of monitoring lists in the HICMan trial]." *Z Evid Fortbild Qual Gesundheitsw* 105(6): 434-445.
- 37) Galy, B., D. Ferring-Appel, S. W. Sauer, S. Kaden, S. Lyoumi, H. Puy, S. Kolker, H. J. Grone and M. W. Hentze (2010). "Iron regulatory proteins secure mitochondrial iron sufficiency and function." *Cell Metab* 12(2): 194-201.
- 38) Galy, B., D. Ferring, B. Minana, O. Bell, H. G. Janser, M. Muckenthaler, K. Schumann and M. W. Hentze (2005). "Altered body iron distribution and microcytosis in mice deficient in iron regulatory protein 2 (IRP2)." *Blood* 106(7): 2580-2589.
- 39) Gardner, P. R. (1997). "Superoxide-driven aconitase FE-S center cycling." *Biosci Rep* 17(1): 33-42.
- 40) Gauthier, L. D., J. L. Greenstein, B. O'Rourke and R. L. Winslow (2013). "An integrated mitochondrial ROS production and scavenging model: implications for heart failure." *Biophys J* 105(12): 2832-2842.
- 41) Giordano, F. J. (2005). "Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure." *J Clin Invest* 115(3): 500-508.
- 42) Gopalakrishna, R. and W. B. Anderson (1989). "Ca²⁺- and phospholipid-independent activation of protein kinase C by selective oxidative modification of the regulatory domain." *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(17): 6758-6762.
- 43) Grimm, M. and J. H. Brown (2010). "Beta-adrenergic receptor signaling in the heart: role of CaMKII." *J Mol Cell Cardiol* 48(2): 322-330.
- 44) Gunshin, H., B. Mackenzie, U. V. Berger, Y. Gunshin, M. F. Romero, W. F. Boron, S. Nussberger, J. L. Gollan and M. A. Hediger (1997). "Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter." *Nature* 388(6641): 482-488.
- 45) Haas, J. D. and T. t. Brownlie (2001). "Iron deficiency and reduced work capacity: a critical review of the research to determine a causal relationship." *J Nutr* 131(2S-2): 676S-688S; discussion 688S-690S.
- 46) Han, D., R. Canali, J. Garcia, R. Aguilera, T. K. Gallaher and E. Cadenas (2005). "Sites and mechanisms of aconitase inactivation by peroxynitrite: modulation by citrate and glutathione." *Biochemistry* 44(36): 11986-11996.
- 47) Handelman, G. J. and N. W. Levin (2008). "Iron and anemia in human biology: a review of mechanisms." *Heart Fail Rev* 13(4): 393-404.

- 48)Hastka J., H. H., Metzgeroth G. (2011). "Eisenmangel und Eisenmangelanämie." www.onkopedia.com.
- 49)Heinzel, F. R., N. MacQuaide, L. Biesmans and K. Sipido (2011). "Dyssynchrony of Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum as subcellular mechanism of cardiac contractile dysfunction." *J Mol Cell Cardiol* 50(3): 390-400.
- 50)Hentze, M. W., M. U. Muckenthaler, B. Galy and C. Camaschella (2010). "Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism." *Cell* 142(1): 24-38.
- 51)Herold, G. (2013). *Innere Medizin*.
- 52)Hohl, M., H. Ardehali, F. J. Azuaje, R. A. Breckenridge, W. Doehner, P. Eaton, G. B. Ehret, T. Fujita, R. Gaetani, M. Giacca, G. Hasenfuss, S. Heymans, A. F. Leite-Moreira, W. A. Linke, D. Linz, A. Lyon, M. A. Mamas, M. Oresic, Z. Papp, T. Pedrazzini, M. Piepoli, B. Prosser, R. Rizzuto, G. Tarone, R. Tian, E. van Craenenbroeck, E. van Rooij, T. Wai, G. Weiss and C. Maack (2014). "Meeting highlights from the 2013 European Society of Cardiology Heart Failure Association Winter Meeting on Translational Heart Failure Research." *Eur J Heart Fail* 16(1): 6-14.
- 53)Hoppe, U. C., E. Erdmann and K. Kommission Klinische (2001). "[Guidelines for the treatment of chronic heart failure. Issued by the Executive Committee of the German Society of Cardiology--Heart and Circulation Research, compiled on behalf of the Commission of Clinical Cardiology in cooperation with Pharmaceutic Commission of the German Physicians' Association]." *Z Kardiol* 90(3): 218-237.
- 54)Houser, S. R. and K. B. Margulies (2003). "Is depressed myocyte contractility centrally involved in heart failure?" *Circ Res* 92(4): 350-358.
- 55)Ichikawa, Y., M. Bayeva, M. Ghanefar, V. Potini, L. Sun, R. K. Mutharasan, R. Wu, A. Khechaduri, T. Jairaj Naik and H. Ardehali (2012). "Disruption of ATP-binding cassette B8 in mice leads to cardiomyopathy through a decrease in mitochondrial iron export." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(11): 4152-4157.
- 56)Ingwall, J. S. and R. G. Weiss (2004). "Is the failing heart energy starved? On using chemical energy to support cardiac function." *Circ Res* 95(2): 135-145.
- 57)Jankowska, E. A., J. Malyszko, H. Ardehali, E. Koc-Zorawska, W. Banasiak, S. von Haehling, I. C. Macdougall, G. Weiss, J. J. McMurray, S. D. Anker, M. Gheorghiade and P. Ponikowski (2013). "Iron status in patients with chronic heart failure." *Eur Heart J* 34(11): 827-834.
- 58)Jankowska, E. A., P. Rozentryt, A. Witkowska, J. Nowak, O. Hartmann, B. Ponikowska, L. Borodulin-Nadzieja, W. Banasiak, L. Polonski, G. Filippatos, J. J. McMurray, S. D. Anker and P. Ponikowski (2010). "Iron

- deficiency: an ominous sign in patients with systolic chronic heart failure." *Eur Heart J* 31(15): 1872-1880.
- 59) Jankowska, E. A., S. von Haehling, S. D. Anker, I. C. Macdougall and P. Ponikowski (2013). "Iron deficiency and heart failure: diagnostic dilemmas and therapeutic perspectives." *Eur Heart J* 34(11): 816-829.
- 60) Jeffery, C. J. (2009). "Moonlighting proteins--an update." *Mol Biosyst* 5(4): 345-350.
- 61) Jordan, J. B., L. Poppe, M. Haniu, T. Arvedson, R. Syed, V. Li, H. Kohno, H. Kim, P. D. Schnier, T. S. Harvey, L. P. Miranda, J. Cheetham and B. J. Sasu (2009). "Hepcidin revisited, disulfide connectivity, dynamics, and structure." *J Biol Chem* 284(36): 24155-24167.
- 62) Kaiser, J. T., T. Clausen, G. P. Bourenkow, H. D. Bartunik, S. Steinbacher and R. Huber (2000). "Crystal structure of a NifS-like protein from *Thermotoga maritima*: implications for iron sulphur cluster assembly." *J Mol Biol* 297(2): 451-464.
- 63) Kell, D. B. (2009). "Iron behaving badly: inappropriate iron chelation as a major contributor to the aetiology of vascular and other progressive inflammatory and degenerative diseases." *BMC Med Genomics* 2: 2.
- 64) Kemna, E. H., H. Tjalsma, H. L. Willems and D. W. Swinkels (2008). "Hepcidin: from discovery to differential diagnosis." *Haematologica* 93(1): 90-97.
- 65) Kempf, T. W., K. ; (2013). Persönliche Mitteilung.
- 66) Khechaduri, A., M. Bayeva, H. C. Chang and H. Ardehali (2013). "Heme levels are increased in human failing hearts." *J Am Coll Cardiol* 61(18): 1884-1893.
- 67) Kirchhefer, U., W. Schmitz, H. Scholz and J. Neumann (1999). "Activity of cAMP-dependent protein kinase and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human hearts." *Cardiovasc Res* 42(1): 254-261.
- 68) Kohlhaas, M., T. Liu, A. Knopp, T. Zeller, M. F. Ong, M. Bohm, B. O'Rourke and C. Maack (2010). "Elevated cytosolic Na⁺ increases mitochondrial formation of reactive oxygen species in failing cardiac myocytes." *Circulation* 121(14): 1606-1613.
- 69) Kohlhaas, M. and C. Maack (2011). "Interplay of defective excitation-contraction coupling, energy starvation, and oxidative stress in heart failure." *Trends Cardiovasc Med* 21(3): 69-73.
- 70) Kohlhaas, M. and C. Maack (2013). "Calcium release microdomains and mitochondria." *Cardiovasc Res* 98(2): 259-268.

- 71) Levi, S. and E. Rovida (2009). "The role of iron in mitochondrial function." *Biochim Biophys Acta* 1790(7): 629-636.
- 72) Li, L., J. Desantiago, G. Chu, E. G. Kranias and D. M. Bers (2000). "Phosphorylation of phospholamban and troponin I in beta-adrenergic-induced acceleration of cardiac relaxation." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278(3): H769-779.
- 73) Li, Y., T. T. Huang, E. J. Carlson, S. Melov, P. C. Ursell, J. L. Olson, L. J. Noble, M. P. Yoshimura, C. Berger, P. H. Chan, D. C. Wallace and C. J. Epstein (1995). "Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase." *Nat Genet* 11(4): 376-381.
- 74) Lill, R. (2003). "Die essentielle Funktion der Mitochondrien bei der Biogenese von Eisen-Schwefel-Proteinen." *BIOspektrum*.
- 75) Lipinski, P., R. R. Starzynski, J. C. Drapier, C. Bouton, T. Bartlomieczyk, B. Sochanowicz, E. Smuda, A. Gajkowska and M. Kruszewski (2005). "Induction of iron regulatory protein 1 RNA-binding activity by nitric oxide is associated with a concomitant increase in the labile iron pool: implications for DNA damage." *Biochem Biophys Res Commun* 327(1): 349-355.
- 76) Lloyd-Jones, D. M., M. G. Larson, E. P. Leip, A. Beiser, R. B. D'Agostino, W. B. Kannel, J. M. Murabito, R. S. Vasan, E. J. Benjamin, D. Levy and S. Framingham Heart (2002). "Lifetime risk for developing congestive heart failure: the Framingham Heart Study." *Circulation* 106(24): 3068-3072.
- 77) Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *J Biol Chem* 193(1): 265-275.
- 78) Lyon, A. R., K. T. MacLeod, Y. Zhang, E. Garcia, G. K. Kanda, M. J. Lab, Y. E. Korchev, S. E. Harding and J. Gorelik (2009). "Loss of T-tubules and other changes to surface topography in ventricular myocytes from failing human and rat heart." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(16): 6854-6859.
- 79) Maack, C. (2008). "Das Zusammenspiel von Calcium, mitochondrialer Energetik und oxidativem Stress in Herzmuskelzellen." *magazin forschung*.
- 80) Maack, C., T. Kartes, H. Kilter, H. J. Schafers, G. Nickenig, M. Böhm and U. Laufs (2003). "Oxygen free radical release in human failing myocardium is associated with increased activity of rac1-GTPase and represents a target for statin treatment." *Circulation* 108(13): 1567-1574.
- 81) Maack, C. and B. O'Rourke (2007). "Excitation-contraction coupling and mitochondrial energetics." *Basic Res Cardiol* 102(5): 369-392.

- 82) Maier, L. S. and D. M. Bers (2007). "Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart." *Cardiovasc Res* 73(4): 631-640.
- 83) Maier, L. S., T. Zhang, L. Chen, J. DeSantiago, J. H. Brown and D. M. Bers (2003). "Transgenic CaMKII δ C overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca²⁺ handling: reduced SR Ca²⁺ load and activated SR Ca²⁺ release." *Circ Res* 92(8): 904-911.
- 84) Mantena, S. K., A. L. King, K. K. Andringa, H. B. Eccleston and S. M. Bailey (2008). "Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of alcohol- and obesity-induced fatty liver diseases." *Free Radic Biol Med* 44(7): 1259-1272.
- 85) Mastroberardino, P. G., E. K. Hoffman, M. P. Horowitz, R. Betarbet, G. Taylor, D. Cheng, H. M. Na, C. A. Gutekunst, M. Gearing, J. Q. Trojanowski, M. Anderson, C. T. Chu, J. Peng and J. T. Greenamyre (2009). "A novel transferrin/TfR2-mediated mitochondrial iron transport system is disrupted in Parkinson's disease." *Neurobiol Dis* 34(3): 417-431.
- 86) McKie, A. T., P. Marciani, A. Rolfs, K. Brennan, K. Wehr, D. Barrow, S. Miret, A. Bomford, T. J. Peters, F. Farzaneh, M. A. Hediger, M. W. Hentze and R. J. Simpson (2000). "A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation." *Mol Cell* 5(2): 299-309.
- 87) McMurray, J. J., S. Adamopoulos, S. D. Anker, A. Auricchio, M. Bohm, K. Dickstein, V. Falk, G. Filippatos, C. Fonseca, M. A. Gomez-Sanchez, T. Jaarsma, L. Kober, G. Y. Lip, A. P. Maggioni, A. Parkhomenko, B. M. Pieske, B. A. Popescu, P. K. Ronnevik, F. H. Rutten, J. Schwitter, P. Seferovic, J. Stepinska, P. T. Trindade, A. A. Voors, F. Zannad, A. Zeiher and E. S. C. C. f. P. Guidelines (2012). "ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC." *Eur Heart J* 33(14): 1787-1847.
- 88) Meyron-Holtz, E. G., M. C. Ghosh, K. Iwai, T. LaVaute, X. Brazzolotto, U. V. Berger, W. Land, H. Ollivierre-Wilson, A. Grinberg, P. Love and T. A. Rouault (2004). "Genetic ablations of iron regulatory proteins 1 and 2 reveal why iron regulatory protein 2 dominates iron homeostasis." *EMBO J* 23(2): 386-395.
- 89) Moens, A. L., E. Takimoto, C. G. Tocchetti, K. Chakir, D. Bedja, G. Cormaci, E. A. Ketner, M. Majmudar, K. Gabrielson, M. K. Halushka, J. B. Mitchell, S. Biswal, K. M. Channon, M. S. Wolin, N. J. Alp, N. Paolocci, H. C. Champion and D. A. Kass (2008). "Reversal of cardiac hypertrophy and fibrosis from pressure overload by tetrahydrobiopterin: efficacy of

- recoupling nitric oxide synthase as a therapeutic strategy." *Circulation* 117(20): 2626-2636.
- 90) Muckenthaler, M. U., B. Galy and M. W. Hentze (2008). "Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network." *Annu Rev Nutr* 28: 197-213.
- 91) Muhlenhoff, U., N. Richhardt, M. Ristow, G. Kispal and R. Lill (2002). "The yeast frataxin homolog Yfh1p plays a specific role in the maturation of cellular Fe/S proteins." *Hum Mol Genet* 11(17): 2025-2036.
- 92) Munoz, M., J. A. Garcia-Erce and A. F. Remacha (2011). "Disorders of iron metabolism. Part 1: molecular basis of iron homeostasis." *J Clin Pathol* 64(4): 281-286.
- 93) Murphy, M. P. (2009). "How mitochondria produce reactive oxygen species." *Biochem J* 417(1): 1-13.
- 94) Nanas, J. N., C. Matsouka, D. Karageorgopoulos, A. Leonti, E. Tsolakis, S. G. Drakos, E. P. Tsagalou, G. D. Maroulidis, G. P. Alexopoulos, J. E. Kanakakis and M. I. Anastasiou-Nana (2006). "Etiology of anemia in patients with advanced heart failure." *J Am Coll Cardiol* 48(12): 2485-2489.
- 95) Neubauer, S. (2007). "The failing heart--an engine out of fuel." *N Engl J Med* 356(11): 1140-1151.
- 96) Neumann, T., J. Biermann, R. Erbel, A. Neumann, J. Wasem, G. Ertl and R. Dietz (2009). "Heart failure: the commonest reason for hospital admission in Germany: medical and economic perspectives." *Dtsch Arztebl Int* 106(16): 269-275.
- 97) Nickel, A., M. Kohlhaas and C. Maack (2014). "Mitochondrial reactive oxygen species production and elimination." *J Mol Cell Cardiol* 73: 26-33.
- 98) O'Rourke, B. and C. Maack (2007). "The role of Na dysregulation in cardiac disease and how it impacts electrophysiology." *Drug Discov Today Dis Models* 4(4): 207-217.
- 99) Pantopoulos, K. and M. W. Hentze (1995). "Rapid responses to oxidative stress mediated by iron regulatory protein." *EMBO J* 14(12): 2917-2924.
- 100) Pantopoulos, K. and M. W. Hentze (1998). "Activation of iron regulatory protein-1 by oxidative stress in vitro." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(18): 10559-10563.
- 101) Peslova, G., J. Petrak, K. Kuzelova, I. Hrdy, P. Halada, P. W. Kuchel, S. Soe-Lin, P. Ponka, R. Sutak, E. Becker, M. L. Huang, Y. Suryo Rahmanto, D. R. Richardson and D. Vyorral (2009). "Hepcidin, the hormone of iron metabolism, is bound specifically to alpha-2-macroglobulin in blood." *Blood* 113(24): 6225-6236.

- 102) Piacentino, V., 3rd, C. R. Weber, X. Chen, J. Weisser-Thomas, K. B. Margulies, D. M. Bers and S. R. Houser (2003). "Cellular basis of abnormal calcium transients of failing human ventricular myocytes." *Circ Res* 92(6): 651-658.
- 103) Pieske, B. and S. R. Houser (2003). "[Na⁺]_i handling in the failing human heart." *Cardiovasc Res* 57(4): 874-886.
- 104) Pieske, B., L. S. Maier, V. Piacentino, 3rd, J. Weisser, G. Hasenfuss and S. Houser (2002). "Rate dependence of [Na⁺]_i and contractility in nonfailing and failing human myocardium." *Circulation* 106(4): 447-453.
- 105) Puccio, H. and M. Koenig (2000). "Recent advances in the molecular pathogenesis of Friedreich ataxia." *Hum Mol Genet* 9(6): 887-892.
- 106) Puy, H., L. Gouya and J. C. Deybach (2010). "Porphyrias." *Lancet* 375(9718): 924-937.
- 107) Qiu, A., M. Jansen, A. Sakaris, S. H. Min, S. Chattopadhyay, E. Tsai, C. Sandoval, R. Zhao, M. H. Akabas and I. D. Goldman (2006). "Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption." *Cell* 127(5): 917-928.
- 108) Recalcati, S., G. Minotti and G. Cairo (2010). "Iron regulatory proteins: from molecular mechanisms to drug development." *Antioxid Redox Signal* 13(10): 1593-1616.
- 109) Rizzuto, R., M. R. Duchen and T. Pozzan (2004). "Flirting in little space: the ER/mitochondria Ca²⁺ liaison." *Sci STKE* 2004(215): re1.
- 110) Salahudeen, A. A., J. W. Thompson, J. C. Ruiz, H. W. Ma, L. N. Kinch, Q. Li, N. V. Grishin and R. K. Bruick (2009). "An E3 ligase possessing an iron-responsive hemerythrin domain is a regulator of iron homeostasis." *Science* 326(5953): 722-726.
- 111) Shaw, G. C., J. J. Cope, L. Li, K. Corson, C. Hersey, G. E. Ackermann, B. Gwynn, A. J. Lambert, R. A. Wingert, D. Traver, N. S. Trede, B. A. Barut, Y. Zhou, E. Minet, A. Donovan, A. Brownlie, R. Balzan, M. J. Weiss, L. L. Peters, J. Kaplan, L. I. Zon and B. H. Paw (2006). "Mitoferrin is essential for erythroid iron assimilation." *Nature* 440(7080): 96-100.
- 112) Sheftel, A. D. and R. Lill (2009). "The power plant of the cell is also a smithy: the emerging role of mitochondria in cellular iron homeostasis." *Ann Med* 41(2): 82-99.
- 113) Sripetchwandee, J., J. Sanit, N. Chattipakorn and S. C. Chattipakorn (2013). "Mitochondrial calcium uniporter blocker effectively prevents brain mitochondrial dysfunction caused by iron overload." *Life Sci* 92(4-5): 298-304.

- 114) Steinberg, S. F. (2013). "Oxidative stress and sarcomeric proteins." *Circ Res* 112(2): 393-405.
- 115) Stewart, S., K. MacIntyre, S. Capewell and J. J. McMurray (2003). "Heart failure and the aging population: an increasing burden in the 21st century?" *Heart* 89(1): 49-53.
- 116) Takemoto, M., K. Node, H. Nakagami, Y. Liao, M. Grimm, Y. Takemoto, M. Kitakaze and J. K. Liao (2001). "Statins as antioxidant therapy for preventing cardiac myocyte hypertrophy." *J Clin Invest* 108(10): 1429-1437.
- 117) Technologies, L. "The Molecular Probes Handbook." <https://www.lifetechnologies.com/de/de/home/references/molecular-probes-the-handbook/probes-for-reactive-oxygen-species-including-nitric-oxide/generating-and-detecting-reactive-oxygen-species.html#head4>.
- 118) Tong, W. H. and T. A. Rouault (2007). "Metabolic regulation of citrate and iron by aconitases: role of iron-sulfur cluster biogenesis." *Biometals* 20(3-4): 549-564.
- 119) Turrens, J. F. (2003). "Mitochondrial formation of reactive oxygen species." *J Physiol* 552(Pt 2): 335-344.
- 120) Vashisht, A. A., K. B. Zumbrennen, X. Huang, D. N. Powers, A. Durazo, D. Sun, N. Bhaskaran, A. Persson, M. Uhlen, O. Sangfelt, C. Spruck, E. A. Leibold and J. A. Wohlschlegel (2009). "Control of iron homeostasis by an iron-regulated ubiquitin ligase." *Science* 326(5953): 718-721.
- 121) Viatte, L. and S. Vaulont (2009). "Hepcidin, the iron watcher." *Biochimie* 91(10): 1223-1228.
- 122) von Haehling, S., E. A. Jankowska, D. J. van Veldhuisen, P. Ponikowski and S. D. Anker (2015). "Iron deficiency and cardiovascular disease." *Nat Rev Cardiol* 12(11): 659-669.
- 123) Wagner, S., N. Dybkova, E. C. Rasenack, C. Jacobshagen, L. Fabritz, P. Kirchhof, S. K. Maier, T. Zhang, G. Hasenfuss, J. H. Brown, D. M. Bers and L. S. Maier (2006). "Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na⁺ channels." *J Clin Invest* 116(12): 3127-3138.
- 124) Wagner, S., A. G. Rokita, M. E. Anderson and L. S. Maier (2013). "Redox regulation of sodium and calcium handling." *Antioxid Redox Signal* 18(9): 1063-1077.
- 125) Walden, W. E., A. I. Selezneva, J. Dupuy, A. Volbeda, J. C. Fontecilla-Camps, E. C. Theil and K. Volz (2006). "Structure of dual function iron regulatory protein 1 complexed with ferritin IRE-RNA." *Science* 314(5807): 1903-1908.

- 126) Wang, J. and K. Pantopoulos (2011). "Regulation of cellular iron metabolism." *Biochem J* 434(3): 365-381.
- 127) Weber, C. R., V. Piacentino, 3rd, S. R. Houser and D. M. Bers (2003). "Dynamic regulation of sodium/calcium exchange function in human heart failure." *Circulation* 108(18): 2224-2229.
- 128) Weiss, G. and L. T. Goodnough (2005). "Anemia of chronic disease." *N Engl J Med* 352(10): 1011-1023.
- 129) Weiss, R. G., G. Gerstenblith and P. A. Bottomley (2005). "ATP flux through creatine kinase in the normal, stressed, and failing human heart." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(3): 808-813.
- 130) Weisser-Thomas, J., V. Piacentino, 3rd, J. P. Gaughan, K. Margulies and S. R. Houser (2003). "Calcium entry via Na/Ca exchange during the action potential directly contributes to contraction of failing human ventricular myocytes." *Cardiovasc Res* 57(4): 974-985.
- 131) WHO, W. H. O. (1995).
- 132) Willis, W. T. and P. R. Dallman (1989). "Impaired control of respiration in iron-deficient muscle mitochondria." *Am J Physiol* 257(6 Pt 1): C1080-1085.
- 133) Xu, L., J. P. Eu, G. Meissner and J. S. Stamler (1998). "Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation." *Science* 279(5348): 234-237.
- 134) Ying, W. (2008). "NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences." *Antioxid Redox Signal* 10(2): 179-206.
- 135) Yusuf, S. and B. Pitt (2002). "A lifetime of prevention: the case of heart failure." *Circulation* 106(24): 2997-2998.
- 136) Yuvaniyama, P., J. N. Agar, V. L. Cash, M. K. Johnson and D. R. Dean (2000). "NifS-directed assembly of a transient [2Fe-2S] cluster within the NifU protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(2): 599-604.
- 137) Zhang, A. S. and C. A. Enns (2009). "Molecular mechanisms of normal iron homeostasis." *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 207-214.

7 Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ALAS2	δ -Aminolaevulinat-Synthase 2
ATP	Adenosintriphosphat
α -KGDH	alpha-Ketoglutaratdehydrogenase
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Ca^{2+}	Calcium
$[\text{Ca}^{2+}]_i$	Intrazelluläre Calciumkonzentration
$[\text{Ca}^{2+}]_m$	Mitochondriale Calciumkonzentration
CMH	1-Hydroxy-3-Methoxycarbonyl-2, 2, 5, 5-Tetramethylpyrrolidin
CN	Cyanid
Cre	Recombinase
CaMKII	Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
DCF	Dichlorodihydrofluoreszindiazetat
$\Delta\Psi_m$	mitochondriales Membranpotential
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNP	Dinitrophenol
ETC	Elektronentransportkette, Atmungskette
FAD	Oxidiertes Flavin-Adenin-Dinukleotid

FADH ₂	Reduziertes Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCCP	Carbonylcyanid- <i>p</i> -trifluoromethoxyphenylhydrazon
FCS	Fetales Kalbsserum
FeS	Eisen-Schwefel
GPX	Glutathionperoxidase
GSH	Glutathion
h	Stunde
Hz	Hertz [1/s]
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IDH	Isocitratdehydrogenase
IRE	Iron responsive element
IRP1/IRP2	Iron regulatory protein 1/2
IRP1/IRP2-KO	IRP1/IRP2-Knockout
Iso	Isoprenalin
K ⁺	Kalium
λ	Wellenlänge [m]
l	Liter
LTCC	L-Type Calcium Channels
LV	Linksventrikulär, linker Ventrikel
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
MCU	mitochondrialer Ca ²⁺ -Uniporter
MDH	Malatdehydrogenase
Mitos	Mitochondrien

ml	Milliliter	
μl	Mikroliter	
Mn-SOD	Mangan-abhängige Superoxiddismutase	
mol	Mol	
nmol, μol, mmol	Nanomol, Mikromol, Millimol	
n	Anzahl der Zellen / Experimente	
Na ⁺	Natrium	
[Na ⁺] _i	Intrazelluläre Natriumkonzentration	
NAD ⁺	Oxidiertes Dinukleotid	Nicotinamid-Adenin-
NADH	Reduziertes Dinukleotid	Nicotinamid-Adenin-
NADP ⁺	Oxidiertes Dinukleotid-Phosphat	Nicotinamid-Adenin-
NADPH	Reduziertes Dinukleotid-Phosphat	Nicotinamid-Adenin-
Nnt	Nicotinamid-Nucleotid- Transhydrogenase	
NT	Normaltyrode	
NYHA	New York Heart Association Classification of Heart Failure	
•O ₂ ⁻	Superoxidanionen	
pH	pH-Wert = negativ dekadischer Logarithmus der	

	Protonenkonzentration
PLB	Phospholamban
PM	Pyruvat/Malat
PMT	Photomultiplier
PRX	Peroxiredoxin
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RyR	Ryanodin Rezeptor
s	Sekunde
SEM	standard error of the mean = Standardfehler des Mittelwertes
SERCA	SR-Ca ²⁺ -ATPase
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TCA	Tricarboxylic acid, Citratzyklus
TG	Transgen
TRX	Thioredoxin
U/min	Umdrehungen pro Minute
vs.	versus
WHO	World Health Organisation, Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

8 Curriculum Vitae

9 Danksagung

„Wenn du schnell gehen möchtest, geh alleine.

Doch wenn du weit gehen möchtest, geh mit anderen.“

Die vorliegende Dissertation mag mich als Autorin ausweisen, jedoch wäre die Anfertigung dieser Arbeit ohne die Hilfe und Unterstützung der im Folgenden genannten Personen wohl unmöglich gewesen.

An erster Stelle ist mein Doktorvater Herr Prof. Dr. med. Christoph Maack zu nennen. Schon zum Zeitpunkt unserer ersten Begegnung – im Rahmen der Kardiologie-Vorlesung in meinem 1. Klinischen Semester – faszinierte mich auf Anhieb deine mitreißende Begeisterung für die Medizin und wissenschaftliche Forschung. Im Rahmen der Laborarbeit und der Verschriftlichung meiner Dissertation verstandest du dich stets darauf, auch in mir eben diese Begeisterung zu entwickeln, meine Motivation selbst während wissenschaftlicher „Durststrecken“ aufrechtzuerhalten und somit auch schwierigeren Tagen etwas Positives abzugewinnen. Mit deiner Person wird in Homburg ein großartiger Mensch, Arzt und Wissenschaftler fehlen.

Der wichtigste Ansprechpartner während meiner gesamten Zeit im Labor war unbestritten Herr Dr. rer. nat. Alexander Nickel. In jederlei Hinsicht, seien es methodische, wissenschaftliche oder sonstige Fragestellungen, brachtest du mir stets Geduld entgegen und standest mir mit Rat und Tat zur Seite, auch an langen Messtagen in der Dunkelkammer oder in der Biophysik. Ich danke dir für deine unermüdliche Hilfe, ohne die ich diese Dissertation nicht hätte vollenden können.

Ein großer Dank gilt selbstredend Herrn Prof. Dr. med. Michael Böhm für die Möglichkeit zur Nutzung der kardiologischen Forschungslaboratorien, was die Anfertigung meiner Dissertation erst möglich gemacht hat.

Auch allen Mitarbeitern der kardiologischen Laboratorien gebührt großer Dank, insbesondere Herrn Dr. rer. nat. Michael Kohlhaas, Frau Michelle Gulentz, Frau Nina Schnellbach, und Herrn Dr. rer. nat. Michael Wagner, für die geduldige Einarbeitung in die Labormethoden und die großartige Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Herrn Prof. Dr. Kai Wollert und Herrn PD Dr. Tibor Kempf von der Medizinischen Hochschule Hannover möchte ich für die Bereitstellung der Versuchstiere danken, welche die Grundlage für unsere Experimente darstellten.

Bedanken möchte ich mich weiterhin bei meinen Kommilitonen und Doktorandenkollegen für die spannenden Jahre im Labor und im Studium. Besonders ist an dieser Stelle Frau Carolin Krug zu erwähnen: ich danke dir für die unvergessliche gemeinsame Zeit während des klinischen Abschnittes im Studium und die oft stundenlangen produktiven Diskussionen über unsere Dissertationen.

Vielen Dank an meine engsten Freundinnen und Freunde – für alles.

Letztendlich möchte ich den allergrößten Dank meiner Familie aussprechen, ganz besonders meinen Eltern und meinem Bruder, die in jeglicher Hinsicht mein Vorbild darstellen. Der Wert eurer immerwährenden Unterstützung und bedingungslosen Liebe in allen Lebenslagen ist für mich nicht in Worte zu fassen. Dies hat mir in jeglicher Hinsicht mein gesamtes Studium und die Arbeit an dieser Dissertation erst ermöglicht. Euch widme ich diese Arbeit.